

NOTE TO USERS

Page(s) not included in the original manuscript and are unavailable from the author or university. The manuscript was scanned as received.

49 - 54,171 - 172 & 179

This reproduction is the best copy available.

UMI[®]

Université de Sherbrooke

L'oxydation de la cytosine dans l'ADN et sa réparation

par

Sébastien Tremblay

Département de radiobiologie et médecine nucléaire

Thèse présentée à la faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de

philosophiae doctor (Ph.D.) en radiobiologie et médecine nucléaire

2004



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 0-494-05862-5

Our file Notre référence

ISBN: 0-494-05862-5

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

*« La science restera toujours la satisfaction du plus haut désir
de notre nature, la curiosité ; elle fournira à l'homme le seul
moyen qu'il ait pour améliorer son sort. Elle préserve de
l'erreur plutôt qu'elle ne donne la vérité ; mais c'est déjà
quelque chose d'être sûr de n'être pas dupe. »*

Ernest Renan

À Catherine, Ludovic, Jérôme et Marius

TABLE DES MATIÈRES

Résumé

Liste des tableaux et figures	iv
--	-----------

Liste des abréviations	v
-------------------------------------	----------

Chapitre I – Introduction	1
--	----------

I.1 Structure de l'ADN.....	1
-----------------------------	---

I.2 Sources des ERO et dommages causés à la cellule	3
---	---

I.2.1 Les espèces réactives de l'oxygène.....	3
---	---

I.2.2 Formation in vivo des ERO	4
---------------------------------------	---

I.2.2.1 Sources endogènes	4
---------------------------------	---

I.2.2.2 Sources exogènes	5
--------------------------------	---

I.2.2.3 La cible des ERO et certains effets biologiques.....	6
--	---

I.2.3 Système de détoxification des ERO dans la cellule	7
---	---

I.2.3.1 Système enzymatique.....	8
----------------------------------	---

I.2.3.2 Système moléculaire	9
-----------------------------------	---

I.2.3.3 Séquestration des métaux	10
--	----

I.2.4 Système in vitro de génération des ERO et d'oxydation des molécules biologiques	11
--	----

I.2.4.1 Peroxyde d'hydrogène.....	12
-----------------------------------	----

I.2.4.2 Rayonnement ionisant	13
------------------------------------	----

I.2.4.3 Rayonnement ultraviolet (UV).....	15
I.2.4.4 Oxydation de la dCyd par le permanganate de potassium (KMnO ₄)	15
I.3 Altérations chimiques des bases	16
I.3.1 Oxydation de la dCyd par H ₂ O ₂ en milieu aéré et par l'effet indirect des radiations ionisantes.	17
I.3.2 Oxydation de la dCyd par des photosensibilisateurs en milieu aéré et par l'effet direct des radiations ionisantes.....	19
I.3.3 Altération de la dCyd par le rayonnement ultraviolet.....	21
I.3.4 Oxydation dirigé par le permanganate de potassium (KMnO ₄).....	22
I.4 Systèmes de détection des dommages dans l'ADN et sur les bases.....	23
I.5 Altération spontanées sur l'ADN.....	25
I.5.1 Formations de tautomères	26
I.5.2 Sites apuriniques et apyrimidiques (AP).....	27
I.5.3 Processus de désamination	28
I.5.3.1 Processus de désamination thermique.....	29
I.5.3.2 Induction enzymatique de la désamination	30
I.5.3.3 Désamination induite par le stress oxydatif	32
I.6 La mutagenèse induite par les ERO.....	34
I.7 Le système de réparation de l'ADN	38
I.8 Description du projet de recherche	45
Chapitre II – Premier article	48
2'-Deoxycytidine Glycols, a Missing Link in the Free Radical-mediated Oxidation of DNA <u>Sébastien Tremblay</u> , Thierry Douki, Jean Cadet, and J. Richard Wagner <i>Journal of Biological Chemistry</i> 274(30): 20833-20838; 1999	

Chapitre III – Deuxième article	55
Efficient excision of cytosine glycols from oxidized poly(dG-dC) and poly(dI-dC) by endonuclease III	
<u>Sébastien Tremblay</u> and J. Richard Wagner	
<i>Nucleic Acids Research</i> : soumis le 15 mai 2004	
Chapitre IV –Troisième article	90
Oxidation of 2'-deoxycytidine to imidazolidine products: interconversion of four diastereomers	
<u>Sébastien Tremblay</u> , Tsvetane Ganchev, Luc Tremblay, Pierre Lavigne, Jean Cadet, J. Richard Wagner	
<i>Journal of American Chemical Society</i> : en préparation	
Chapitre V –Discussion	122
Chapitre VI – Perspectives et conclusion	146
Remerciements	148
Références	149
Annexe I – Quatrième Article	170
Oxidation of 5-Hydroxy-2'-Deoxyuridine into Isodialuric Acid, dialuric Acid and Hydantoin Products	
Johann Rivière, François Bergeron, <u>Sébastien Tremblay</u> , Didier Gasparuto, Jean Cadet and J. Richard Wagner*	
<i>Journal of American Chemical Society</i> 126(21): 6548-6549; 2004	
Annexe II – Cinquième article	180
Incorporation of two deoxycytidine oxidation products into cellular DNA	
J. Richard Wagner, <u>Sébastien Tremblay</u> , Bonnie Gowans, and Darel J. Hunting	
<i>Biochemistry and Cell Biology</i> 75(4) : 377-381; 1997	

Listes des schémas et figures

Figure 1. Pontage Watson-Crick dans un appariement conventionnel	1
Figure 2. Système de prévention des ERO dans une cellule.....	8
Figure 3. Exemple d'interrelation entre les différents systèmes d'antioxydant à l'intérieur de la cellule	10
Figure 4. Réaction de Fenton en présence de métaux de transitions	12
Figure 5. Réaction d'Haber-Weiss	13
Figure 6. Étapes de formation des radicaux lors du passage d'un rayonnement ionisant	13
Figure 7. Le caractère des événements observés à la suite d'une irradiation	14
Schéma 1. L'oxydation induite de la dCyd par le radical hydroxyle en milieu aéré	19
Schéma 2. Décomposition du radical cation de la dCyd	20
Schéma 3. Formation et décomposition des photohydrates de dCyd	22
Schéma 4. Oxydation de la dCyd par le KMnO_4	23
Figure 8. Structure des différents tautomères et des pontages hydrogènes reliés	27
Figure 9. Représentation globale des interactions des ERO sur l'ADN cellulaire	35
Figure 10. Représentation de la réparation dans une cellule eucaryote	38
Figure 11. Les différents types de réparation par excision de bases	42
Figure 12. Formation et réparations des diols de 5-MetdCyd dans l'ADN.....	44
Figure 13. Effet cellulaire de l'oxydation de la dCyd	45
Schéma 5. Mécanisme proposé d'épimérisation du diol de dCyd	125
Schéma 6. Catalyse basique de la déshydratation des photohydrates de dCyd	128
Schéma 7. Mécanisme de formation carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxo-imidazolidines..	141
Schéma 8. Interconversion des 1-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxo-imidazolidines	143

Abréviations

dCyd,	2'-désoxycytidine
dUrd,	2'-désoxyuridine
Thd,	thymidine
dAdo,	2'-désoxyadénosine
5-MedCyd,	5-méthyl-2'-désoxycytosine
cyt,	cytosine
ura,	uracile
thy,	thymine
gua,	guanine
ade,	adénine
5-MeCyt,	5-methylcytosine
H ₂ O ₂ ,	peroxyde d'hydrogène
8-oxo-dGuo,	8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine
8-oxo-dAdo,	8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyadénosine
oh ⁵ dCyd,	5-hydroxy-2'-désoxycytidine
oh ⁵ dUrd,	5-hydroxy-2'-désoxyuridine
diols de dCyd,	5,6-dihydroxy-5,6-dihydro-2'-désoxycytidine
diols de dUrd,	5,6-dihydroxy-5,6-dihydro-2'-désoxyuridine
oh ⁵ Cyt,	5-hydroxy-cytosine
oh ⁵ Ura,	5-hydroxy-uracile
8-oxo-Gua,	8-oxo-7,8-dihydro-guanine
8-oxo-Ade,	8-oxo-7,8-dihydro-adénine

dR,	2-désoxyribose
site AP	site dans l'ADN sans base qui est dit : apurinique et apyrimidique
KMnO ₄	permanganate de potassium
OsO ₄	osmium tetraoxyde
CHLP,	chromatographie liquide à haute performance
UV,	détecteur ultra violet pour CHLP
EC,	détecteur électrochimique pour CHLP
endoIII	endonucléase III
ung,	uracil DNA N-glycosylase
fpg,	formamidopyrimidine glycosylase
NER	réparation par excision de nucléoside
BER	réparation par excision de base
MMR,	réparation de bases mésappariées
VSP,	réparation d'excision de base de type court
SM,	spectre de masse
CG-SM,	chromatographe à phase gazeuse couplé avec un SM
IPA-SMSM,	système d'ionisation à pression ambiante couplé à 2 SM en série
CL-IPA-SMSM,	chromatographie liquide couplé à un système API-SMSM
PCNA,	antigène nucléaire de prolifération cellulaire
XP,	xenoderma pigmentosum
ERO,	espèces réactives de l'oxygène

Résumé

Les effets des radicaux libres (espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (RNS)) dans des organismes vivants sont de plus en plus étudiés dans différentes sphères de recherche. Ils sont impliqués dans différents processus biologiques tels la formation des prostaglandines et la réponse immunitaire, mais ils ont aussi des effets délétères qui sont impliqués dans la mutagenèse, la carcinogenèse, certaines maladies neurodégénératives et le vieillissement. Dans l'organisme, les radicaux libres peuvent avoir différentes sources comme les radiations ionisantes et la respiration cellulaire. Le radical hydroxyle est l'espèce radicalaire qui est principalement responsable de l'oxydation de l'ADN au niveau biologique. Il est issu de la réduction de H_2O_2 par les métaux de transitions tels le Cu^+ et le Fe^{2+} et provient aussi de la radiolyse de l'eau par les radiations ionisantes. Ces radicaux libres, en réagissant avec l'ADN, vont générer différents dommages sur celui-ci : des cassures de simple brin et double brin, générer des sites abasiques, des liens covalents inter et intrabrins ainsi qu'avec des protéines et finalement, des bases modifiées. Ces bases modifiées peuvent être une source d'erreur lors de la réplication cellulaire et conduire à des mutations. Les mutations les plus rencontrées lors d'un stress oxydatif impliquant les espèces réactives de l'oxygène sont des transitions GC→AT. Des études de mutagenèse dans des bactéries *E. coli* indiquent que les produits d'oxydation de la dCyd jouent un rôle important. Les diols de 2'-désoxycytidine (5,6-dihydroxy-5,6-dihydro-2'-désoxycytidine) sont les produits majeurs de la réaction du radical hydroxyle avec la 2'-désoxycytidine (dCyd). Toutefois, aucune étude n'a été menée directement sur les diols de dCyd et ce dû à leur grande instabilité ainsi qu'à l'incapacité de les détecter directement.

Il nous a été possible d'isoler un des quatre diastéréoisomères dont la structure a été confirmée par ^1H -RMN et par spectrométrie de masse. Ce diol de dCyd, à pH 7 et 37°C , a un temps de demi-vie ($t_{1/2}$) de 50 minutes et tend à se déshydrater pour donner la 5-hydroxy-2'-désoxycytidine. Sa décomposition est reliée à la concentration d'ion phosphate et ainsi qu'au pH. Des études sur l'ADN de thymus de veau, oxydé par une réaction de Fenton, ont permis de démontrer que le $t_{1/2}$ des diols de dCyd est passé de 50 minutes comme nucléosides libres à 72 h dans un polymère d'ADN soit 85 fois plus stable que le nucléoside libre. Les processus de décomposition dans l'ADN correspondent au 2/3 à la déshydratation et 1/3 à la désamination. L'incorporation des diols de dCyd dans un poly dG-dC par une oxydation au KMnO_4 a montré une excision très rapide de ceux-ci par endo III, une enzyme dans la réparation des pyrimidines modifiées. La vitesse d'excision des diols de dCyd par endo III est équivalent aux produits très mutagéniques des diols de dUrd et sont excisés 5 fois plus rapidement que le oh^5dCyd , celui-ci étant peu mutagène.

Finalement, les 5(6)-hydroxy-6(5)-hydroperoxy-5,6-dihydro-2'-désoxycytidine sont les intermédiaires instables majoritaires de l'oxydation de la dCyd par le radical hydroxyle en milieu aéré. Afin d'étudier spécifiquement l'hydroperoxyde majoritaire (le 5-hydroxy-6-hydroperoxy-5,6-dihydro-2'-désoxycytidine), une méthode non radicalaire de le synthétiser à partir de bromohydrine été effectuée. Il se décompose de façon majoritaire en 4 isomères de N1-(2-désoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-carbamoyle-5,6-dihydroxy-2-oxoimidazolidine qui ont été isolés. Ces quatre diastéréoisomères à 37°C s'interconvertissent par isomérisation en N1-C5 à pH acide et une isomérisation en N3-C4 qui apparaît à pH basique.

Chapitre I - Introduction

I.1 Structure de l'ADN

L'ADN ou acide désoxyribonucléique est le support génétique de l'information cellulaire. Depuis la découverte de la structure double hélice de l'ADN en 1953 par Watson et Crick, plusieurs études ont porté sur le rôle de cette molécule dans la cellule. L'ADN est formé de l'enchaînement de quatre sous unités nommés nucléotides. Un nucléotide est formé d'un groupement phosphate, d'un pentose et d'une base azotée. C'est la base azotée qui détermine l'identité du nucléotide dont les quatre qui constituent principalement l'ADN sont : l'adénine, la guanine, la thymine, et finalement la cytosine. Les deux premiers formant la famille des purines les deux derniers les pyrimidines. Les nucléotides sont disposés dans un ordre déterminé appelé séquence et maintenu par le lien phosphodiester. En 1953, à l'aide des photos de christalographie d'ADN par Rosalind Franklin, Watson et Crick ont proposé que l'ADN possède une structure double hélice ressemblant aux montants d'une échelle dont les barreaux seraient formés par les liaisons hydrogène entre les bases où le dCyd est appariée avec le dGuo par trois ponts hydrogène ($C \equiv G$) et la Thd est appariée avec dAdo par deux pont hydrogène ($T = A$) (voir figure 1).

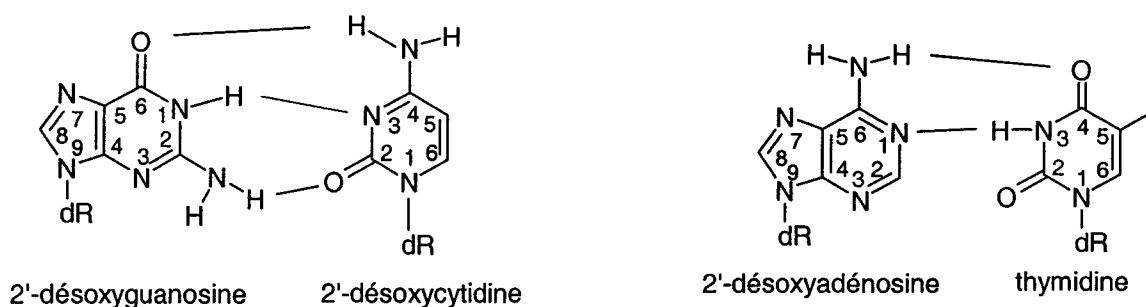


Figure 1. Pontage hydrogène dans un appariement Watson-Crick conventionnel

Ces séquences déterminent en elle-même, lorsque traduites, la structures des acides aminées formant les protéines, par conséquent le phénotype observé chez un individu. Dans les organismes pluricellulaires, lorsque le gamète mâle rencontre l'homologue femelle pour la fertiliser, d'une cellule unique, le bagage génétique devra être répliqué des milliers à des milliards de fois pour former un organisme complexe, d'où l'importance d'une réplication avec une haute fidélité. Par exemple, la réplication du génome humain demande de copier 6×10^9 bases en 6 à 7 heures. Il est estimé que 3000 fourches de réplifications actives se partagent le travail et que chacune d'elles doit répliquer 50 paires de base à la seconde (McGowan, 2003). La réplication de l'ADN est effectuée par un système enzymatique complexe, mais de façon simplifiée, il est bien connu que la double hélice est séparée en deux par des hélicases et que chaque brin devient une matrice de réplication pour les polymérases qui reconnaissent les ponts hydrogène de la matrice de réplication afin d'ajouter le bon nucléotide, de plus, les polymérases possèdent un domaine de "proof-reading" afin de minimiser les erreurs commises (Alberts et al., 1994; Lehninger et al., 1993; Shevelev & Hubscher, 2002). Ces bases sont susceptibles à être modifiées par certains agents chimiques dont les radicaux libres. Si des altérations ont lieu au site de pontage hydrogène, l'appariement existant sera changé ce qui conduira dès lors à une modification du code génétique qui sera fixé lors de la réplication. Trois classes d'altérations spontanées capables de générer des mutations sont rencontrées dans la cellule : la formation de tautomère, la formation de sites apuriques-apyrimidiques ainsi que la désamination des bases (Friedberg et al., 1995), qui peuvent aussi être induites par l'attaque des radicaux libres sur ces bases.

I.2 Sources des ERO et dommages causés

I.2.1 Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Les différentes espèces excitées de l'oxygène impliqués dans le stress oxydatif aux cellules ont été détectées in vivo par des techniques variées telles la radiolyse pulsée, la photolyse éclair, la spectroscopie RPE par mesure directe ou par capture de spin, aussi par des méthodes indirects dosant les dommages issus de leur réaction avec les molécules biologiques. Ces techniques ont donc permis de mettre en évidence les espèces suivantes : l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroperoxyde (HO_2^{\bullet}) qui est la forme protonée de $O_2^{\bullet-}$, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical hydroxyle (HO^{\bullet}), les radicaux alkoxy (RO^{\bullet}), les radicaux peroxy (ROO^{\bullet}), les hydroperoxydes organiques ($ROOH$) et l'oxygène singulet (1O_2). Il y a aussi des espèces réactives de l'azote qui se forment lors du stress oxydatif tels : le radical nitroxyde (NO^{\bullet}), le dioxyde d'azote (NO_2^{\bullet}), le peroxyxynitrite ($ONOO^{\bullet}$) et sa forme protonée l'acide peroxyxynitrique ($ONOOH$) (Berliner et al., 2001; Jiang et al., 1996; Khan & Swartz, 2002; Novakov et al., 2001; Tabatabaei & Abbot, 1999; Tarpey et al., 2004). Les espèces réactives de l'azote (RNS) ne seront pas spécifiquement abordées, puisque leur réactivité face aux acides nucléiques semble être surtout reliée à la nitrosylation de la guanine, ainsi qu'à la désamination directe de la cytosine induit par le peroxyxynitrite, toutefois ces résultats de désamination ont été remis en question. Finalement, les autres effets sont dus à la formation de radicaux hydroxyle produits par la décomposition des RNS, ce qui sera alors comparable aux dommages causés par les ERO (Cadet et al., 2003; Wiseman & Halliwell, 1996).

I.2.2 Formation in vivo des ERO

I.2.2 .1 Sources endogènes

Dans les cellules, les processus biochimiques et physiologiques sont des sources endogènes de ERO tels : la β -oxydation des acides gras dans les peroxysomes, la détoxification d'agents xénobiotiques par la famille des cytochromes P-450, la formation des précurseurs des hormones stéroïdiennes par l'oxydation de l'acide arachidonique à l'aide des cytochromes P-450 monooxygénases, la défense du système immunitaire contre des corps étrangers (myeloperoxydase, NADH oxydase) et la chaîne de transport d'électrons dans les mitochondries sont des exemples de générateurs des espèces réactives de l'oxygène. La respiration cellulaire qui réduit l'oxygène en eau à travers la chaîne de transport d'électrons mitochondriale pour la production d'énergie sous forme d'ATP est le plus grand générateur endogène de radicaux libres (Lenaz, 1998). Elle utilise le NADH et FADH_2 qui proviennent de la glycolyse, du cycle de Krebs et de la β -oxydation comme réducteur au complexe I et II en fournissant les 4 électrons nécessaires pour la réduction d'une molécule d'oxygène en deux molécules d'eau (Alberts et al., 1994; Halliwell & Gutteridge, 1999; Lenaz, 1998). Toutefois une perte d'électron est observée au complexe I et III, la NADH Coenzyme Q oxydase (I) qui transfère l'électron à l'ubiquinone et l'ubiquinone cytochrome c oxydase (III) où l'ubiquinol passe en forme radical semi-quinone, ces deux complexes sont capables de transférer directement un électron à l'oxygène et former l'anion superoxyde (Halliwell & Gutteridge, 1999; Turrens, 1997). Une étude sur le rat a démontré de 1 à 2 % de perte d' O_2 par les mitochondries pour une génération 2×10^{10} molécules d' $\text{O}_2^{\cdot -}$ et de H_2O_2 par cellule par jour (Ames et al., 1993; Boveris & Chance, 1973; Chance et al., 1979). D'autres études émettent des valeurs

autour de 0.1% de perte d'oxygène par les mitochondries (Imlay & Fridovich, 1991; Nohl & Hegner, 1978). La différence entre ces deux études est attribuée à la concentration d'oxygène utilisée lors des expériences sur des mitochondries isolées, de 20% dans le premier cas, et de 5% dans la seconde étude. Un niveau de 5% représentant une meilleure réalité des quantités présentes dans le cytoplasme. Toutefois, même à 0.1%, la quantité produite demeure de l'ordre des 10^9 molécules d' $O_2^{\bullet -}$ par cellule par jours, ce qui est considérable. L'anion superoxyde est une espèce peu réactive face aux biomolécules tel l'ADN (Cadet & Téoule, 1978), toutefois la superoxyde dismutase présente, soit dans la mitochondrie ou le cytoplasme, catalyse la dismutation de deux anions superoxyde avec deux protons pour former une molécule de peroxyde d'hydrogène et d'oxygène. Une partie du peroxyde d'hydrogène ainsi formé peut migrer à travers la cellule. Lorsqu'il est mis en présence de métaux de transition, par réaction de Fenton, il va former le radical hydroxyle qui oxyde très rapidement toutes les biomolécules avoisinantes (Halliwell & Gutteridge, 1999; Henle & Linn, 1997; von Sonntag, 1987).

I.2.2.2 Sources exogènes

Les ERO peuvent provenir aussi de l'extérieur de la cellule, ils sont alors dits exogènes. Les radiations ionisantes font partie des sources exogènes de ERO. On nomme radiations ionisantes tout faisceau de photons ou de particules avec suffisamment d'énergie pour enlever un électron à un atome. Elles ont deux sources : les désintégrations radioactives d'atomes instables tel le radon ou d'origine artificielle tel les rayons X. La radioactivité est un processus soit de décomposition d'atomes ou de formation en de nouveaux éléments (réorganisation nucléaire), qui émettent des particules et/ou des photons de hautes énergies capables de générer des ionisations. Ces ionisations peuvent se

produisent directement sur les molécules biologiques ce qui est nommé effet direct, ou soit par une ionisation du milieu environnant, l'eau pour les molécules biologiques, générant ainsi des espèces réactives qui vont attaquer par la suite les biomolécules, un phénomène dit indirect. Ce processus sera décrit de façon plus approfondie dans la section I.2.4.2 car nous sommes continuellement bombardés par le rayonnement ionisant provenant de sources cosmiques tel le soleil et aussi par les atomes instables de la croûte terrestre tel le radon (Hussain et al., 1994; von Sonntag, 1987).

I.2.2.3 La cible des ERO et certains effets biologiques

Les ERO très réactifs, tel le radical hydroxyle, vont réagir dans un rayon très restreint avec toutes les biomolécules environnantes soit : les protéines, les lipides, les acides nucléiques, en les modifiant chimiquement et ce avec des constantes de vitesses proches de la diffusion (Halliwell & Gutteridge, 1999; von Sonntag, 1987). D'autres ERO moins réactives, tels H_2O_2 , sont capables de diffuser à travers les différents compartiments cellulaires, et donc, vont avoir un rayon d'action plus étendu puis agir par une réaction secondaire. Des études de microdosimétrie capables d'effectuer l'irradiation sélective de la membrane externe, du cytoplasme et du noyau cellulaire ont démontré que la survie cellulaire était beaucoup plus affectée lorsque le noyau était irradié versus le cytoplasme ou la membrane cellulaire (Datta et al., 1976; Munro, 1970a; Munro, 1970b) et démontrent que l'ADN est un site très sensible aux radicaux libres. Les espèces réactives de l'oxygène sont reliées au vieillissement ainsi qu'à certaines maladies neurodégénératives et au cancer (Beckman & Ames, 1998; Loeb & Loeb, 2000). Une corrélation inversement proportionnelle entre la production des ERO par les mitochondries de différents animaux et leur espérance de vie maximale a été démontrée

(Ku et al., 1993; Sohal et al., 1990). De plus, les dommages oxydatifs à l'ADN excrétés dans l'urine sont plus élevés chez les animaux aux taux métaboliques élevés que chez l'homme (Adelman et al., 1988). Une corrélation directement proportionnelle entre les niveaux de superoxyde dismutase, (une des enzymes responsables de la détoxification des radicaux libres dans les organismes aérobies dans différents organismes) et leur espérance de vie maximum a aussi été observée (Cutler, 1985; Tolmasoff et al., 1980). De plus, il a aussi été démontré que les dommages à l'ADN augmentent avec l'âge (Barja & Herrero, 2000; Hamilton et al., 2001; Izzotti et al., 1999; Van Remmen et al., 2003). La restriction alimentaire qui est associée à une diminution du taux métabolique, a pour effet de prolonger l'espérance de vie chez les individus d'une même espèce et montre une diminution des dommages à l'ADN pour les animaux avec une diète moins riche (Hamilton et al., 2001). (Lopez-Torres et al., 2002) Toutes ces observations réunies suggèrent un rôle important des ERO dans le vieillissement.

I.2.3.1 Système de détoxification des ERO dans la cellule

La cellule s'est adaptée à un tel stress oxydatif, même dans les organismes peu évolués tels la bactérie *E. coli* et les levures tout comme les cellules plus évoluées de mammifères qui ont développé un système efficace de défense contre les ERO (voir figure 2). Ce système de défense est demeuré conservé de la bactérie aux organismes plus complexes, suggérant un rôle important et précoce de ces espèces dans l'évolution. Ce système de défense se divise en trois groupes : un système de défense enzymatique, un système constitué de petites molécules antioxydantes et un troisième ayant pour but de séquestrer les métaux et ainsi d'empêcher les réactions de Fenton ou d'Haber-Weiss (Beckman & Ames, 1998; Halliwell & Gutteridge, 1999).

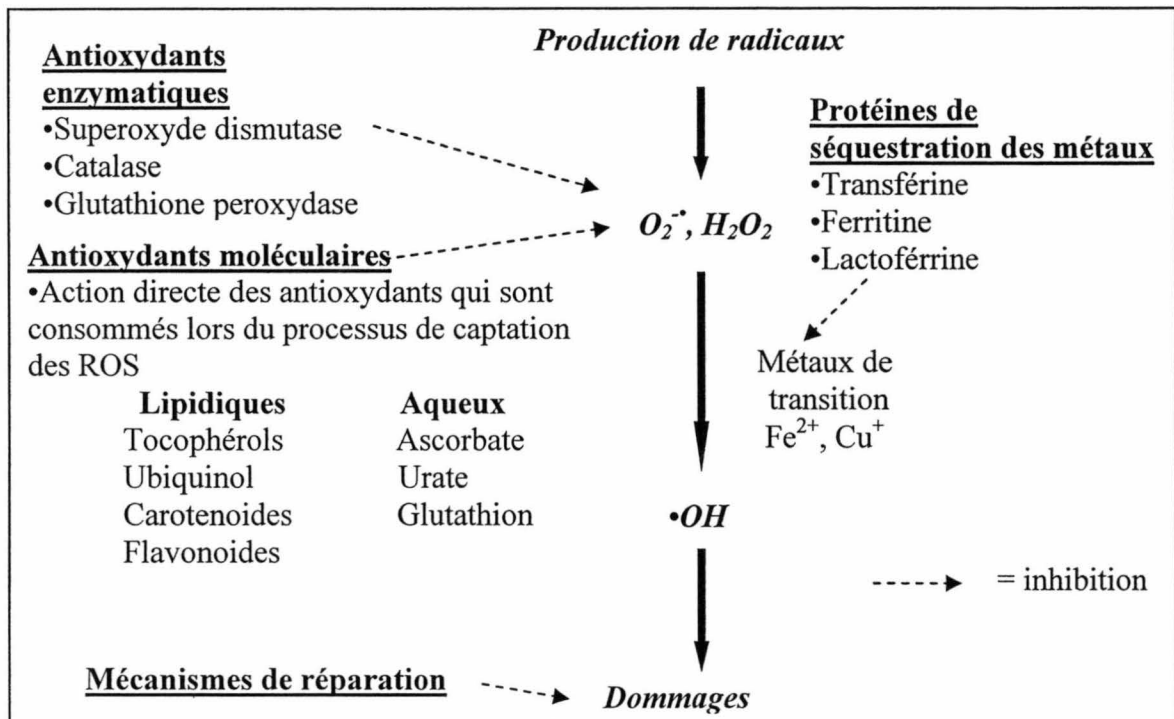


Figure 2. Système de prévention des ERO, adapté de (Young & Woodside, 2001)

I.2.3.2 Système enzymatique

Le système enzymatique est constitué tout d'abord de la superoxyde dismutase qui catalyse la dismutation de deux anions superoxyde avec deux protons pour former du peroxyde d'hydrogène et de l'oxygène, la réaction non-catalysée se déroule à des vitesses de $5 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ contrairement à la réaction catalysée qui à un taux de réaction de $1.6 \times 10^{-9} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ à un pH physiologique donc une efficacité catalytique 3×10^4 fois supérieure à celle spontanée (Halliwell & Gutteridge, 1999). Le H_2O_2 ainsi formé peut ensuite être détoxifié par une catalase en formant de l'eau et de l'oxygène ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$). La glutathion peroxydase catalyse, elle aussi, la réduction de H_2O_2 en utilisant le groupement thiol de la glutathion et forme ainsi le GSSG et 2 molécules d'eau. Ces enzymes sont compartimentées, les catalases se retrouvent dans les peroxysomes tandis que le

glutathion peroxydase est présent dans les mitochondries et le cytoplasme. Les chloroplastes de certaines plantes, n'ayant pas de catalase et de glutathion peroxydase, ont développé une ascorbate peroxydase qui va détoxifier le H_2O_2 en utilisant l'ascorbate comme substrat qu'ils transforment, respectivement, en eau et en déhydroascorbate (Halliwell & Gutteridge, 1999).

I.2.3.3 Système moléculaire

Les antioxydants moléculaires se séparent en deux groupes, ceux liposolubles et ceux hydrosolubles. Ces petites molécules ont la capacité de transférer le radical par un échange d'électrons directement avec la molécule cible et ainsi elles vont devenir radicalaires à leur tour, toutefois, elles ont une réactivité moindre que le radical initial. On retrouve dans la première catégorie dite lipophile comme la β -carotène et la vitamine E qui s'introduisent dans les membranes et préviennent la peroxydation lipidique en générant, pour la vitamine E un radical tocophéryle, moins réactif que le radical hydroxyle ou peroxyde initial. Dans la fraction hydrosoluble des antioxydants cellulaires, on retrouve la vitamine C (acide ascorbique), le glutathion, l'acide urique (Ames et al., 1981). Dans cette catégorie, l'ascorbate est capable de capturer les radicaux libres et former le radical semi-déhydroascorbate, quand deux de ceux-ci se rencontrent, il y a transfert d'un électron de l'un à l'autre pour régénérer une molécule d'ascorbate et un déhydroascorbate (Halliwell & Gutteridge, 1999). Le rôle de ces petites molécules est au niveau de la captation et de la séquestration des radicaux, elles seront soit régénérées ou éliminées. Le glutathion est un système particulier parce qu'il peut agir à différents niveaux, soit directement en régénérant par réduction les radicaux, soit comme cofacteur réducteur avec les systèmes enzymatiques, il peut soit reconvertir le déhydroascorbate en

vitamine C (déhydroascorbate réductase), et finalement détruire l' H_2O_2 sans générer de radicaux et ce par les glutathions peroxydases. De plus il peut être régénéré à son tour par une glutathion réductase qui utilise de l'énergie sous forme de NADPH et ce sans aucune formation de radicaux, ce qui en fait un système terminal. Ce système antioxydant en plus de l'effet direct et individuel de ses constituants, est aussi inter-relié et donc forme une chaîne de détoxification. Un bon exemple de ce système est le transfert des radicaux lipidiques à la vitamine E et qui à son tour est régénérée par la vitamine C qui le transfère au GSH qui va être régénéré par l'utilisation de NADPH, donc le radical initial est annihilé en utilisant de l'énergie provenant du NADPH (voir figure 3).

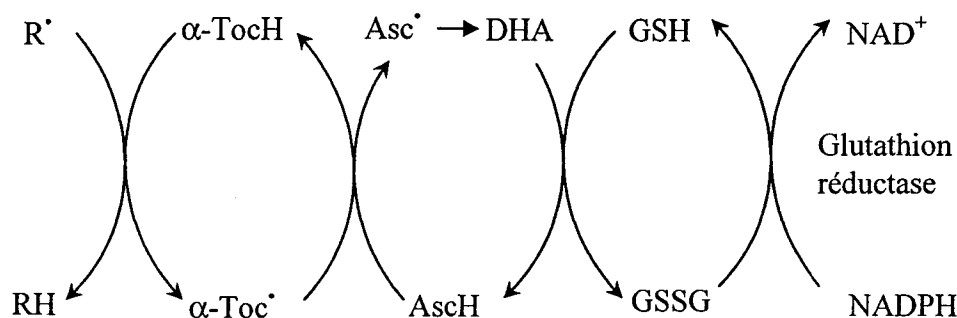


Figure 3. Interrelation entre les différents systèmes enzymatiques et moléculaires dans la réparation des lipides oxydés, adapté de (Fang et al., 2002)

I.2.3.4 Séquestration des métaux

Un système de séquestration des métaux est aussi utilisé dans la cellule et agit comme système de prévention dans la formation des radicaux. Par exemple, la ferritine et la transferrine lie le fer et en plus d'être d'excellents transporteurs, ils séquestrent le fer sous une forme inactive, soit en Fe^{3+} (Andrews, 1999). La caeruloplasmine agit de la même façon en retenant le cuivre et le fer sous leur forme oxydée qui ne peuvent plus interagir dans la réaction de Fenton (Ames et al., 1993; Halliwell & Gutteridge, 1999).

Ces systèmes de défense que les organismes aérobiques ont développés pour se protéger contre les espèces réactives de l'oxygène démontrent l'importance qu'a le stress oxydatif sur la cellule, toutefois malgré ce système complexe de protection contre les ERO, une partie s'en échappe et vont réussir à endommager les molécules biologiques présentes sur leur passage. L'ADN est une cible très sensible aux radicaux libres dans la cellule. Dans des cellules cérébrales de jeunes souris, l'ADN subit environs 500 000 attaques par cellule à chaque jour (Hamilton et al., 2001). La souris ayant un métabolisme oxydatif 18 fois plus rapide que l'homme par unité de masse en dosant les diols de thymine excrétés dans l'urine (Adelman et al., 1988; Cathcart et al., 1984), on peut évaluer qu'environ 28 000 évènements oxydatifs dans l'ADN humain se produisent à chaque jour par cellule. Un système de réparation est donc nécessaire et s'ajoute aux systèmes de prévention des dommages causés aux différentes biomolécules.

I.2.4 Système in vitro de génération des ERO et d'oxydation des molécules biologiques

Il y a différentes façons de générer un stress oxydatif dans un système in vitro ou in vivo afin de reproduire et d'étudier les différents mécanismes de génération, protections et réparations des ERO. Les principales méthodes capables de générer des radicaux libres ou des modifications de bases sont : l'utilisation du peroxyde d'hydrogène en présence de métaux de transition (Fenton, 1899), les radiations ionisantes (von Sonntag, 1987) et non-ionisantes (UV) (Foote, 1991) et l'oxydation par des agents chimiques (KMnO_4).

I.2.4.1 Peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène ne constitue pas en lui-même un produit très réactif face aux bases de l'ADN (Cadet & Téoule, 1978). C'est en présence de métaux de transition tels le fer et le cuivre sous leur forme réduite qu'il y a réduction du H_2O_2 suivi d'une scission hétérolytique pour former le radical hydroxyle et l'anion hydroxyle, cette réaction est appelée réaction de Fenton (figure 4). Le radical hydroxyle réagit soit en s'additionnant aux liaisons doubles ou par l'arrachement d'un atome d'hydrogène. Ces réactions du radical hydroxyle avec la matière biologique se produisent des vitesses comparables à celle de la diffusion (Halliwell & Gutteridge, 1999; von Sonntag, 1987).

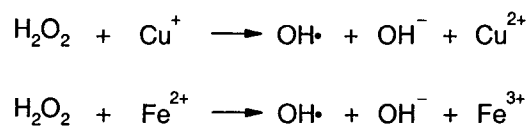


Figure 4. Réaction de Fenton (1899) en présence de cuivre ou de fer.

Une variante de la réaction de Fenton a été découverte par Haber et Weiss en 1932 et les étapes caractérisées par Czapski et Bielski qui impliquent le fer sous forme oxydé donc inactive (catalyseur) en présence de la forme protonée de l'anion superoxyde et montre la formation de radicaux hydroxyle et ce par la réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} par HO_2^\cdot (figure 5)(Czapski & Ilan, 1978; Rush & Bielski, 1985). Au niveau biologique les métaux de transition sont séquestrés sous leur forme oxydée, le mécanisme d'Haber-Weiss permet donc d'expliquer la formation de radicaux hydroxyle à l'intérieur des systèmes biologiques, de plus, il a été démontré que l'anion superoxyde peut libérer les molécules de fer de la ferritine et le rendre ainsi disponible dans la réaction de Fenton (Reif, 1992).

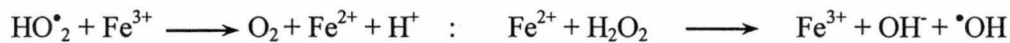


Figure 5. Réaction d'Haber-Weiss (1932).

I.2.4.2 Rayonnement ionisant

Le rayonnement ionisant se caractérise par l'éjection d'un ou plusieurs électrons de son atome par un faisceau de photons ou de particules de hautes énergies. Ils peuvent être de sources naturelles tels les rayons cosmiques ou les désintégrations nucléaires d'atomes instables (dit radioactivité) ou de sources artificielles tel les tubes à rayons X. Le rayonnement ionisant peut agir soit d'une façon directe et arracher des électrons à la cible ou de façon indirecte, via les radicaux formés dans le milieu par l'interaction de celui-ci avec le rayonnement. Les organismes vivants étant fortement constitués en eau (70%), un mécanisme important observé est la radiolyse de l'eau qui se subdivise à son

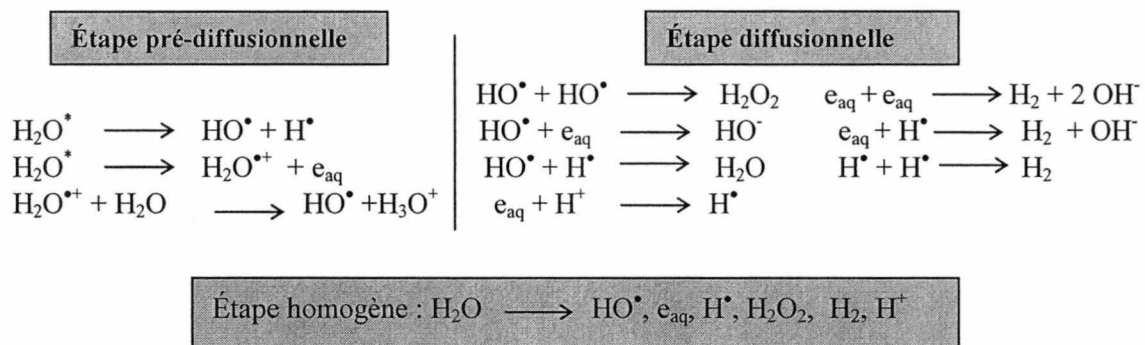


Figure 6. Étapes de formation des radicaux après le passage d'un rayonnement ionisant. tour en trois étapes, soit l'étape pré-diffusionnelle, diffusionnelle et l'étape homogène telles décrites par Ferradini (Ferradini & Pucheault, 1983) (voir figure 6). Les rayonnements ionisants ont la capacité d'exciter ($\text{H}_2\text{O}^\bullet$) et d'ioniser ($\text{H}_2\text{O}^{\bullet+}$) les molécules d'eau. Lors de l'étape pré-diffusionnelle, qui se situe $\leq 10^{-12}$ s après l'évènement primaire,

seul les électrons secondaires sont en mouvement tandis que les molécules d'eau excitées vont aller en scission homolytique pour former HO• et H• tandis que l'eau ionisée va réagir avec une molécule d'eau voisine et former HO• et H₃O⁺, lors de cette étape le mélange est donc hétérogène (voir figure 6). L'étape diffusionnelle se caractérise par le déplacement des espèces formées précédemment qui vont donc se rencontrer et des réactions de recombinaisons entre les radicaux vont se produire pour reformer de l'eau, OH⁻, H₂O₂ et H₂ (voir figure 6), jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. L'étape d'homogénéisation se produit dans les 10⁻⁹ s après le passage du rayonnement et laisse de façon homogène différentes espèces radicalaires et stable qui peut s'écrire globalement HO•, e_{aq}•, H•, H₂O₂, H₂, H⁺ (voir figure 6). Les effets des radiations dans les cellules sont très différents selon l'échelle de temps que l'on observe (figure 7). L'étape physique représente le moment où la molécule cible absorbe l'énergie et ce qui se traduit par une excitation et/ou une ionisation. L'étape physico-chimique se caractérise par la formation

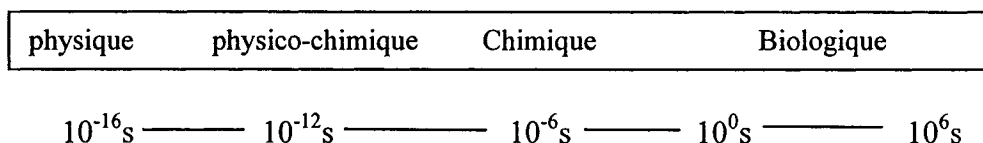


Figure 7. Le caractère des événements observés après le passage du rayonnement ionisant.

de radicaux, leur diffusion et leur homogénéisation. La phase chimique est associée à la réactivité chimique des produits formés avec la cible et finalement, si cette cible est cellulaire, les conséquences telles la mort cellulaire et autres transformations cellulaires sont observées sur une échelle de temps beaucoup plus longue.

I.2.4.3 Rayonnement ultraviolet (UV)

L'ADN absorbe la lumière dans le domaine des ultraviolets (UV). Le rayonnement UV se divise en trois groupes qui dépendent de la longueur d'onde tels : la région 320 à 400 nm qui caractérise les UVA, de 280 à 320 nm pour les UVB et de 200-280 nm pour les UVC. Les UVB et UVC peuvent interagir directement avec l'ADN tandis que les UVA vont plutôt agir par l'intermédiaire d'un photosensibilisateur. L'accumulation d'évidences sur l'effet direct des UV sur l'ADN démontre que les dommages générés de façon majoritaire sont les dimères de pyrimidines, les photoproduits (6-4) pyrimidine-pyrimidone ainsi que leurs isomères de Dewar (Cadet et al., 2001; Ravanat et al., 2001). Lorsqu'un photosensibilisateur est impliqué dans la formation de dommages à l'ADN, il est appelé effet photodynamique qui a été caractérisé par Foote (Foote, 1991). En bref, la première étape consiste à l'absorption d'un photon par le photosensibilisateur qui passera d'un état fondamental à singulet et par la suite à triplet excité. Par la suite le photosensibilisateur peut soit réagir avec le solvant ou le substrat par un transfert de charge ou bien par l'arrachement d'un atome d'hydrogène et former un radical ion ou neutre, cette réaction est dite de type I (voir le schéma 2 à la page 19 pour un exemple sur la cytosine). Le type II se produit en présence d'oxygène, le photosensibilisateur peut soit lui transférer de l'énergie et former l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) qui n'est réactif qu'avec la guanine et forme la 8-oxo-Gua ou effectuer un transfert de charge pour former l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (Ravanat et al., 2001).

I.2.4.4 Oxydation de pyrimidines par le permanganate de potassium

Le permanganate de potassium (KMnO_4) est un oxydant qui réagit de façon spécifique par une hydroxylation vicinale des liaisons doubles pour former, dépendamment

du pH et de la concentration de KMnO_4 , majoritairement des diols et/ou un dérivé avec une alcool et une cétone (Wiberg & Saegebarth, 1957) (voir le schéma 4 à la page 22 pour un exemple avec la cytosine). Le KMnO_4 s'additionne sur les oléfines par la formation d'un intermédiaire ester cyclique, qui fut mis en évidence à l'aide de permanganate marqué à ^{18}O , et qui se décompose pour donner les diols cis et un alcool α -cétonique (Wiberg & Saegebarth, 1957). Des études sur l'acide oléique et la thymidine, montrent que les diols sont favorisés à haut pH et faible concentration de permanganate, tandis qu'à pH neutre et à forte concentration de permanganate, un mélange de diols et du dérivé cétonique est favorisé (Hayatsu & Iida, 1969; Iida & Hayatsu, 1970; Wiberg & Saegebarth, 1957). Il est connu que la forme cétonique ne provient pas d'une suroxydation d'un groupement hydroxyle sur le substrat, mais plutôt d'une compétition entre l'ion hydroxyle (favorise la formation de diols) et le KMnO_4 (favorise la forme cétonique) pour une seconde attaque sur un intermédiaire du complexe oléfine KMnO_4 déjà existant (Coleman et al., 1956; Wiberg & Saegebarth, 1957).

I.3 Altérations chimiques des bases

Les bases de l'ADN peuvent-être altérées par les radicaux libres. Comme il a été mentionné précédemment, l'ADN est formé de nucléotides qui se divisent en deux unités, le sucre et la base reliée, ces bases sont ensuite reliées par un lien phosphodiester. Les radicaux libres sont donc capables d'attaquer l'une de ces deux cibles. Dans le cas du sucre, une attaque par des radicaux libres se fait par l'abstraction d'un atome d'hydrogène et se solde en générale par une coupure du lien phosphodiester et/ou la perte de la base (pour un résumé des schémas de fragmentation du sucre voir review (Breen & Murphy, 1995)). Tandis que l'attaque de la base conduit à une base modifiée, la majorité des

réactions sur la base par le radical hydroxyle se caractérise par une addition sur les liaisons doubles (von Sonntag, 1987). Dans un poly U, environ 5% des dommages se produisent au sucre et 95 % à la base (Deeble et al., 1986). Dans un ADN double brin, il est plutôt évalué que 20% des sucres sont atteints et que 80% des dommages se retrouvent aux bases (Breen & Murphy, 1995), toutefois un ratio de 50% serait plus juste (Cadet,).(von Sonntag, 1987) La hiérarchie des dommages à l'ADN en ordre décroissant est : les dommages aux bases, les coupures simples brins, les sites alcali labiles (c'est-à-dire des dommages convertis en coupures de brins en milieu basique) et les coupures doubles brins (von Sonntag, 1987). D'autres dommages tels des liens intra et interbrins, des liens protéine-ADN, la libération de bases ainsi que la formation des lésions tandems sont aussi observés (Bourdat et al., 2000; Cadet et al., 2003). Dans cette section, vu l'étendue des dommages causés à chaque nucléoside, nous limiterons nos recherches sur la dCyd.

I.3.1 Oxydation de la dCyd par H₂O₂ en milieu aéré et par l'effet indirect des radiations ionisantes.

Il est estimé que 70% des effets létaux provenant des radiations ionisantes sont attribués aux radicaux hydroxyle issus de la radiolyse de l'eau et que 30% sont attribués à l'effet direct sur l'ADN (Ferradini & Pucheault, 1983). La réaction du peroxyde d'hydrogène en présence des métaux de transitions, génère aussi des radicaux hydroxyle (voir section I.2.4.5) qui vont réagir de façon préférentielle à l'addition sur le lien éthylénique 5-6 de la dCyd et la cytosine pour donner à 90 % le radical 5-hydroxy-5,6-dihydro-2'-désoxycytidin-6-yle (2) et à 10 % le radical 6-hydroxy-5,6-dihydro-2'-désoxycytidin-5-yle (3) qui ont été déterminés par radiolyse pulsée (Hazra & Steenken, 1983)(voir schéma 1). En présence d'oxygène, il y a addition sur le radical pour former le

radical peroxy correspondant (Decarroz et al., 1987) qui va être converti en hydroperoxydes correspondants par protonation tout comme les radicaux peroxy de thymidine (Wagner et al., 1994). Le radical peroxy peut aussi décomposer par la perte de $O_2^{\bullet-}$ suivi d'une attaque par un ion hydroxyle (ou l'eau suivie d'une déprotonation) pour donner le diol de dCyd (8) (von Sonntag, 1987). En absence d'oxygène, après l'oxydation du 5-hydroxy-5,6-dihydro-2'-désoxycytidin-6-yle (2) il va y avoir une addition d'une molécule d'eau en position 6 suivi d'une déprotonation pour donner le diol de dCyd (Breen & Murphy, 1995; von Sonntag, 1987). A partir d'expérience avec de $^{18}O_2$, il a été mis en évidence que le 5-hydroxy-6-hydroperoxy-5,6-dihydro-2'-désoxycytidine (6) forme un pont intramoléculaire entre C4-C6 (non illustré) et qu'il se décompose pour donner le *N*1-(2-désoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-carbamoyl-5,6-dihydroxy-2-oxoimidazolidine (12-15) et le *N*1-(2-désoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-biuret (11) principalement ainsi que plusieurs produits issus de l'ouverture du cycle (Cadet et al., 2003; Wagner et al., 1999). Le diol de dCyd est un intermédiaire formé lors de l'attaque par le radical hydroxyle et ce en milieu aéré ou non, car il peut se former par plusieurs voies potentielles. Une étude sur l'oxydation par les radicaux hydroxyle en milieu aéré sur la dCyd montre qu'environ 40 % des produits formés passent par le diol de dCyd (Wagner et al., 1999) et donc le produit le plus formé. Toutefois, en raison de sa très grande instabilité comme monomère, le diol de dCyd (8) se transforme en produits plus stables pour donner le diol de dUrd (10) par désamination et le 5-hydroxy-2'-dCyd (9) par déshydratation (Dizdaroglu et al., 1986; Wagner et al., 1999). Dans le cas du rayonnement ionisant, 70% des dommages sont issus de la radiolyse de l'eau qui forme en grande majorité le radical hydroxyle, comme le peroxyde d'hydrogène (Ward, 1985).

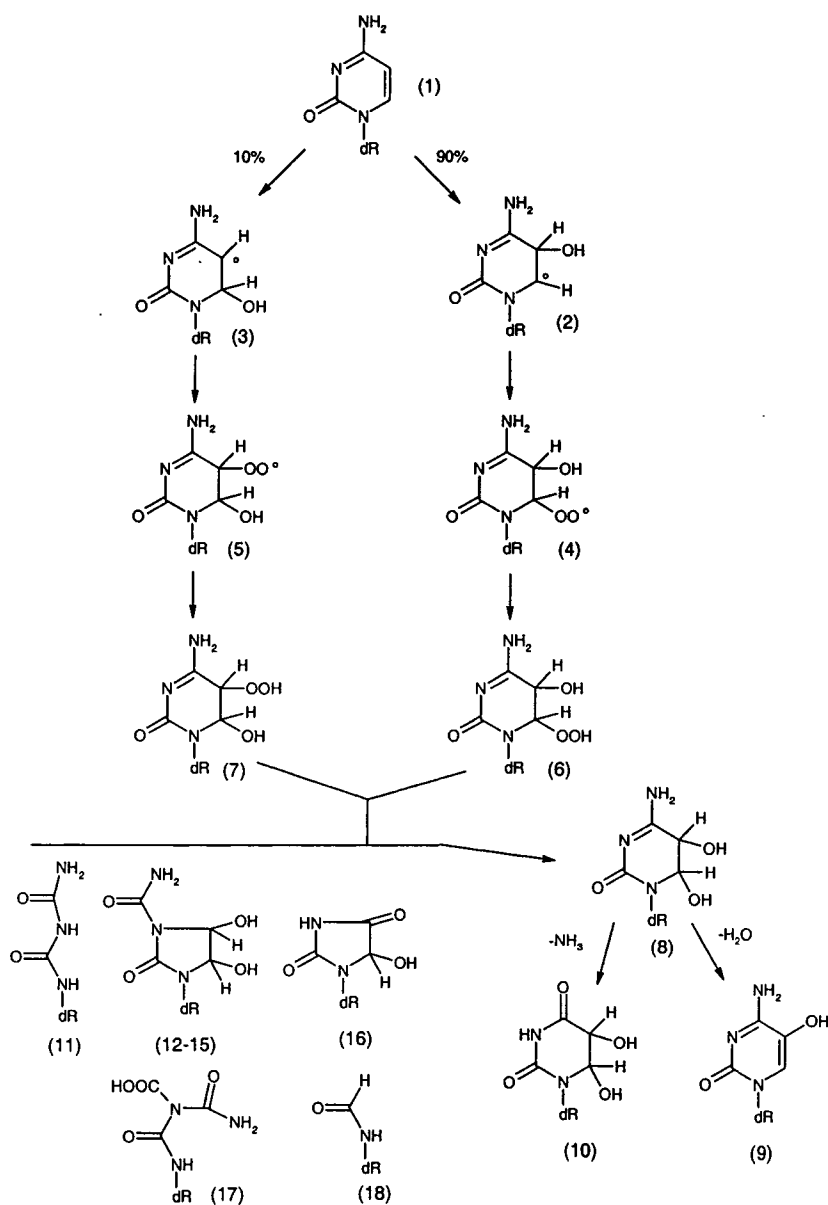


Schéma 1. L'oxydation induite par le radical hydroxyle sur la dCyd en milieu aéré, adapté de (Cadet et al., 1997; Wagner et al., 1999).

I.3.2 Oxydation de la dCyd par des photosensibilisateurs en milieu aéré et par l'effet direct des radiations ionisantes.

La photolyse par la ménadione de la dCyd forme le radical cation (19) (voir schéma 2) qui décompose principalement par hydratation et donne en majorité le radical

6-hydroxy-5,6-dihydro-2'-désoxycytidin-5-yle (3) et plus faiblement 5-hydroxy-5,6-dihydro-2'-désoxycytidin-6-yle (2) (Cadet et al., 1986; Decarroz et al., 1987; Wagner et al., 1990) qui vont former les hydroperoxydes correspondant, et à leur tour réagir par les mêmes voies que ceux issus des radicaux hydroxyles (voir schéma 1). Environ 12% des radicaux cations vont se convertir par déprotonation en radicaux sur l'amine exocyclique

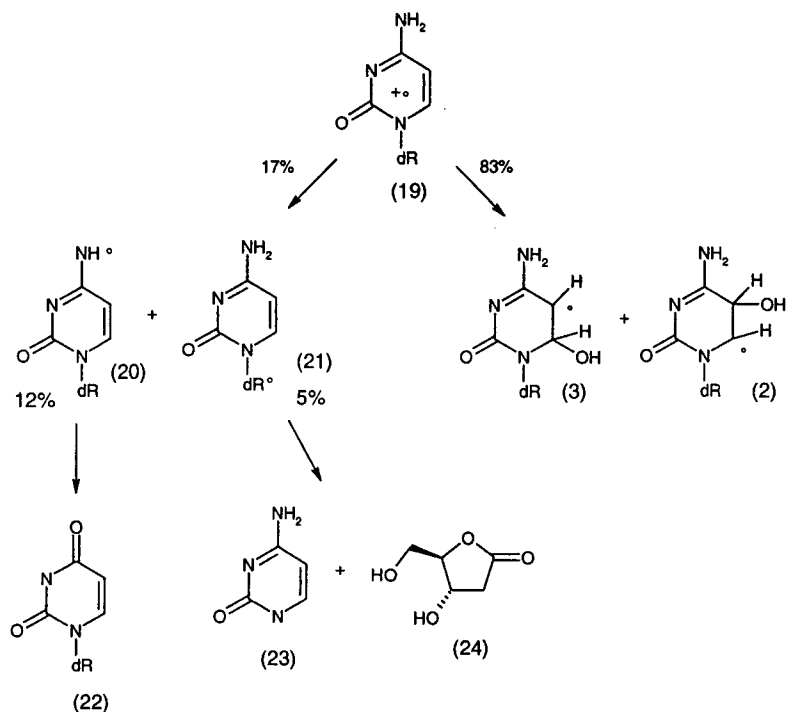


Schéma 2. Décomposition du radical cation de la dCyd induit par photolyse de la ménadione, adapté de (Wagner et al., 1990)

(20) et désaminer pour donner le 2'-désoxyuridine (22) et aussi 5% se traduiront par la formation d'un radical sur le carbone anomérique C1' (21) qui se décompose en 2'-désoxyribonolactone (24) tout en libérant la base (23). Ce radical cation est similaire à celui formé par ionisation directe, qui représente environ 30% des interactions sur la base par un rayonnement ionisant (Bienvenu et al., 1996; Decarroz et al., 1987; Wagner et al., 1990; Ward, 1985).

I.3.3 Altération de la dCyd par le rayonnement ultraviolet

Les UVB et UVC peuvent interagir directement sur la liaison double des pyrimidines ce qui se traduit en générale par la formation des dimères de pyrimidines, de photoproduits (6-4) ainsi que leurs isomères de Dewar (Cadet et al., 2001; Ravanat et al., 2001), mais il y aura aussi l'hydratation de la cytosine pour former les photohydrates dCyd (25). La formation des photohydrates ne représente que de 1-2% des dommages générés par le rayonnement UV (Mitchell et al., 1991). Toutefois leur grande similarité avec les diols de dCyd dans leurs : structures chimiques, potentiel mutagénèse, voies de décompositions et de réparation, en font les meilleurs candidats afin de prédire et des comparer tous ces paramètres sur les diols de dCyd. Les photohydrates dCyd vont se décomposer principalement par déshydratation pour redonner le produit et plus faiblement par désamination du groupement amino sur le C4 remplacer par un groupement cétonique (Moore & Thomson, 1955). Dans le cas de la cytosine et de la 5-méthylcytosine, la saturation du lien 5-6 éthylénique, accélère la désamination d'où la formation respective d'hydrate d'uracile (26) et d'hydrate de thymine qui lorsqu'ils se décomposent par déshydratation donnent respectivement l'uracile (27) et la thymine et en explique la présence dans une solution de cytosine irradiée (Becker et al., 1967; Boorstein et al., 1990; DeBoer et al., 1970; Ganguly et al., 1990; Johns et al., 1965; O'Donnell et al., 1994; Vairapandi & Duker, 1994) (voir schéma 3). Ce qui découle de ces études est la mise en évidence de la stabilisation du dommage lorsqu'il se produit dans la double hélice d'ADN comparativement au nucléoside libre. Le photohydrate dCyd a un $t_{1/2}$ de 29 min à 37°C* et

* Valeur extrapolée à partir des paramètres d'Arrhénius observés sur les photohydrates de dCyd par Johns et al (Johns et al., 1965)

pH7 et ce temps de demi-vie passe à 18-25 heures dans un polymère poly dG-dC (DeBoer et al., 1970; Johns et al., 1965). Le processus de désamination semble demeurer près de 10 % dans le monomère comme dans le polymère de poly dG-dC (Boorstein et al., 1990).

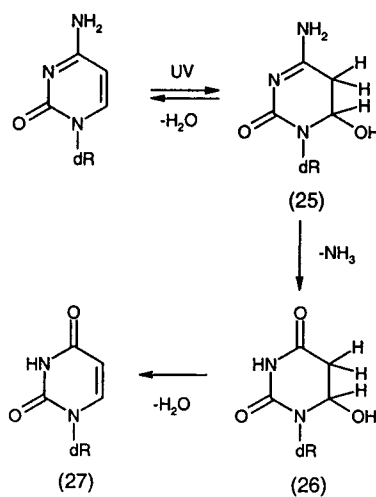


Schéma 3. Formation et décomposition des photohydrates de dCyd (DeBoer et al., 1970)

I.3.4 Oxydation de la dCyd par le permanganate de potassium (KMnO_4)

Le lien 5-6 éthylénique des pyrimidines est particulièrement sensible à l'oxydation par le KMnO_4 . La réactivité du KMnO_4 sur les quatre nucléosides peut être classée comme suit $\text{Thd} > \text{dUrd} > \text{5-MedCyd} > \text{dCyd} > \text{dGuo} > \text{dAdo}$ (Bui & Cotton, 2002; Hayatsu, 1996). Cette réaction est assez spécifique aux pyrimidines pour s'en servir comme méthode de séquençage afin de les distinguer des purines (Lambrinakos et al., 1999; Schmid & Rubin, 1980). Le diol de dCyd (8) et le produit cétonique (29) ont été observés par spectrométrie de masse dans une solution de dCyd tamponnée à pH 7 et traitée par le KMnO_4 (Bui & Cotton, 2002) (voir schéma 4). Les produits, le diol et l'alcool α -

cétonique ont aussi été observés pour la cytosine, la thymine, la thymidine, et l'uracil (Bui & Cotton, 2002; Hayatsu & Iida, 1969; Iida & Hayatsu, 1971a; Iida & Hayatsu, 1971b).

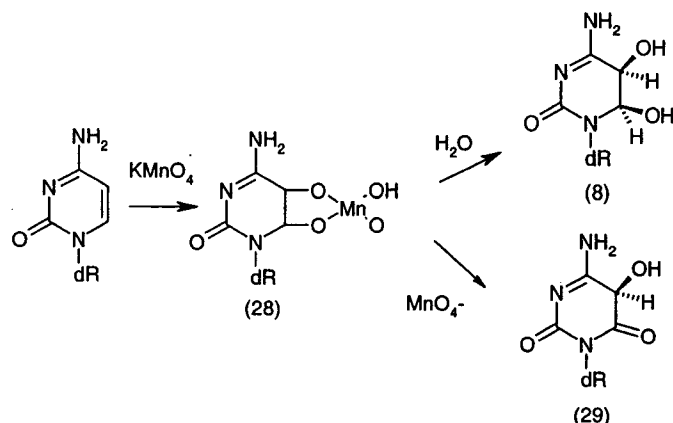


Schéma 4. Oxydation de la cytosine par le KMnO_4 . Adapté de (Bui & Cotton, 2002) et (Wiberg & Saegebarth, 1957)

I.4 Systèmes de détection des dommages dans l'ADN et sur les bases.

Pour déterminer les effets des radicaux libres sur l'ADN, il est essentiel de développer des méthodes de détection et de caractérisation des dommages. La détection des dommages aux bases dans l'ADN doit répondre à certains critères stricts tels : une limite de détection d'une lésion pour 10^5 - 10^7 bases normales pour un échantillon d'au moins 30 μg de l'ADN cellulaire, les dommages doivent être stables, le système doit détecter une multiplicité de dommages et finalement la formation des dommages de façon artefactuelles dû aux procédures d'extractions de l'ADN, doit-être minimisée (Cadet et al., 1999; Cadet et al., 1997; Cadet et al., 1998; Helbock et al., 1998). De façon générale, les différentes méthodes vont nécessiter une extraction de l'ADN sauf celles non-invasives comme la méthode de comète (Cadet et al., 2003).

Il est possible de détecter la lésion dans l'ADN entier ou hydrolysé. Dans l'ADN entier, des méthodes utilisant des anticorps ont été développées tels l'ELISA et RIA, la limite de détection de ces méthodes est d'environ 1 modification par 10^6 bases normales. Des méthodes utilisant des enzymes de réparations peuvent aussi être utilisées sur l'ADN entier, les coupures ou les sites alcalis labiles générées par ces enzymes être dosées par la suite (1 dommage par 10^7 bases normales), toutefois cette méthode manque de spécificité, car ces enzymes de réparations ont en général plusieurs substrats (Cadet et al., 1997).

Plusieurs méthodes nécessitent une extraction suivie d'une hydrolyse de l'ADN et d'un système de discrimination des bases normales de celles modifiées. La séparation des produits peut être effectuée sur différents systèmes chromatographiques tels la chromatographie en phases gazeuse (CG), la chromatographie liquide à haute performance (CLHP). Après la séparation, les différents produits doivent être détectés par des systèmes tels un spectre de masse (SM), des détecteurs électrochimiques et à radioactivité. Le premier inconvénient de ces méthodes est qu'il faut tout d'abord extraire l'ADN, ce qui cause des dommages artefactuels dû à cette extraction (Cadet et al., 2003; Helbock et al., 1998) et en faire l'hydrolyse soit enzymatique ou en milieu acide. Cette formation artefactuelle génère un débat sur les taux basaux réels dans l'ADN cellulaire (Cadet et al., 1997; Dizdaroglu, 1998; Douki et al., 1996a). Le CG-SM, est une méthode versatile dû à son grand pouvoir de séparation, à sa possibilité de caractériser plusieurs lésions à la fois et sa grande précision assurée par la possibilité d'ajouter des standards internes de masses isotopiques différentes. Toutefois la nécessité de dériver les molécules pour les rendre plus volatiles génère des niveaux de dommages de 10 à 50 fois plus élevés

que ceux observés par les autres méthodes et ce en raison du processus d'oxydation des bases non modifiées (Douki et al., 1996a). La technique CHLP couplé à un spectre de masse (CL-IPA-SMSM) permet la versatilité du CG-SM sans les problèmes de dérivation, toutefois son prix élevé diminue son accessibilité. Une méthode peu coûteuse et très sensible, utilisée dans notre laboratoire, est l'utilisation d'un système CHLP couplé à un détecteur électrochimique (EC). L'inconvénient majeur de cette technique de détection est que les produits doivent être facilement oxydables ou réductibles, tel la 8-OH-dCyd , la 8-OH-dUrd , la 8-oxo-dGuo et la 8-oxo-dAdo et donc manque de versatilité. Le deuxième inconvénient est au niveau de l'hydrolyse. L'hydrolyse enzymatique se fait dans des conditions douces et minimise l'auto-oxydation, toutefois elle peut être bloquée par certains types de dommages qui ne pourront être détectés par la suite. L'hydrolyse acide se fait à de hautes températures et coupe le lien glycosidique de tous les dommages, toutefois certains dommages ne sont pas stables dans ces conditions.

Dans la détection des dommages à l'ADN, aucune méthode ne permet de réunir sensibilité, versatilité et minimisation des dommages artéfactuels, il faut donc adapter la technique de détection au dommage que l'on veut détecter.

I.5 Altérations spontanées de l'ADN

Plusieurs types de dommages sont générés dans l'ADN par les radicaux libres tels : les cassures simples et doubles, des liens covalents intra et interbrins, des liens covalents avec les protéines qui l'entourent, les adduits lipidiques aux sucres et bases, la formation de sites apuriniques-apyrimidiques et des modifications de bases. Il sera discuté plus profondément dans la section qui suit, les mécanismes pouvant induire un changement dans les pontages hydrogène. En raison de l'instabilité des diols de dCyd en

nucléoside libre, seul des évidences tirées d'études indirectes impliquent les diols de dCyd dans la mutagénèse ou de façon plus directe ses produits de décomposition. Dans cette section, différents points permettront de comprendre la stabilité des diols dans les différentes formes tels : nucléosides libres, simple brin et double brin en comparant avec des dommages similaires tels les photohydrates. Le rôle des produits de décomposition des diols de dCyd dans la mutagénèse tel la déshydratation qui donne la 5ohdCyd et peut causer un mésappariement dans les formes tautomères ou par désamination pour former les diols de dUrd qui eux vont former une mutation par changement du pairage. Les différents processus de désamination seront abordés pour mieux saisir le rôle des diols de dCyd dans la mutagénèse causée par les ERO.

I.5.1 Formations de tautomères

La formation de tautomères se produit aux groupements chimiques amino et aux carbonyles, ces mêmes groupements qui sont impliqués dans le pairage par les ponts hydrogènes entre les bases. Par exemple la cytosine peut passer de sa forme amino à imino et s'apparier avec l'adénine pour générer une transition C→T. Il en est de même avec l'adénine qui va s'apparier avec la cytosine en générant des transitions A-G. Pour la guanine et la thymine, c'est plutôt un équilibre entre la forme céto-énol, qui vont alors s'apparier respectivement avec la thymine et la guanine (voir figure 8). Toutefois ces formes sont très rares parce que nettement défavorisées. Toutefois, il est possible que la modification chimique d'une de ces bases puisse favoriser la forme imino ou enol et ainsi avoir un pouvoir mutagène plus élevé (Friedberg et al., 1995). Un tel phénomène a d'abord été observé par RMN NOESY avec la N⁴-methoxycytosine, qui est capable dans sa forme imino de s'apparier avec la dAdo dans une géométrie Watson-Crick (Fazakerly

et al., 1993). Une étude par spectroscopie Raman, a démontré que la forme N4 imino du oh^5dCyd est 100 fois plus stable que celle de la $dCyd$ (Wu et al., 1999). Il est probable que ce produit d'oxydation de la $dCyd$ est un rôle dans les transitions $C \rightarrow T$, toutefois une étude sur l'incorporation de oh^5dCyd par des cellules eucaryotes n'a pas démontré de toxicité.

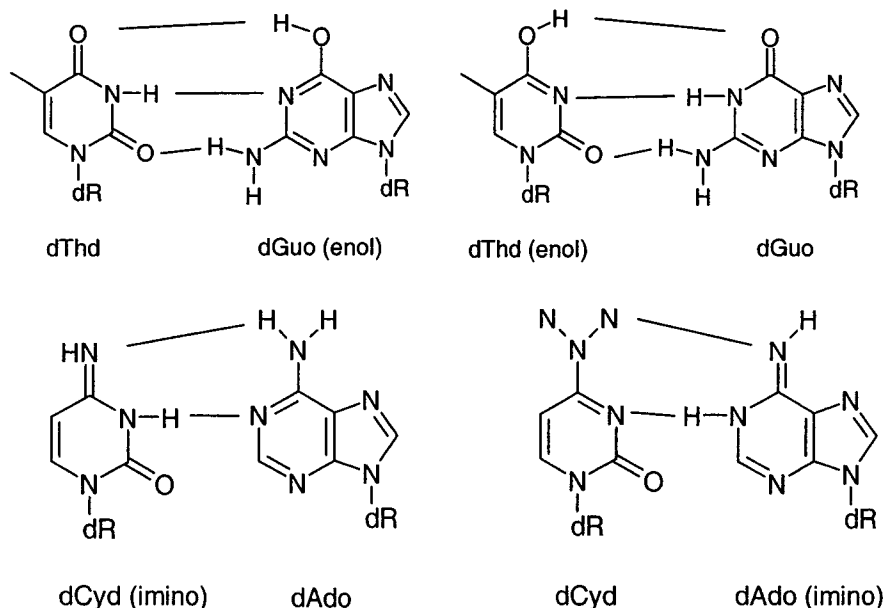


Figure 8. Structure des différents tautomères et des pontages hydrogènes reliés.
(Friedberg et al., 1995)

I.5.2 Sites apuriniques et apyrimidiques (AP)

La formation de sites apuriniques et apyrimidiques peut se produire en milieu acide, d'où le principe de l'hydrolyse acide mais peut aussi se produire à pH neutre ou basique. Dans des conditions de pH, force ionique et température physiologiques, la vitesse de dépurination est évaluée à $3 \times 10^{-11} \text{ s}^{-1}$ (Lindahl & Nyberg, 1972). Il est estimé que dans le génome humain, environ 10000 dépurinations se produisent par cellule/génération (Lindahl, 1979). Du côté des pyrimidines, elles sont beaucoup plus stables, il est estimé que la vitesse de dépyrimidination est 1/20 de la dépurination et

donc a une centaine de dépyrimidination par cellule/ génération (Lindahl & Karlstrom, 1973). Ces sites n'ayant plus de base, il est dorénavant possible pour le pentose (sucre) d'être en équilibre entre sa forme cyclique (furanose) et sa forme aldéhyde ouverte. Dans sa forme aldéhyde il est possible à pH 7 et accentué à pH basique, qu'une attaque électrophile sur le H2' entraîne une β -élimination conduisant à la rupture du lien phosphodiester en 3' (Burrows & Muller, 1998). Ces sites labiles AP ont une vie moyenne de 400h dans l'ADN (Lindahl & Anderson, 1972). De plus, dans le système de réparation par excision de base plusieurs endonucléases sont susceptibles de reconnaître ces sites et produire une coupure du brin en 3' comme le fait le processus naturel ce qui suggère que pour la cellule, qu'il est préférable d'avoir une cassure simple pour rapatrier le système de réparation que de conserver ce site abasique. Le taux de formation de site AP est probablement l'évènement le plus fréquent au niveau des modifications des bases dans la cellule. Les effets seront liés à son potentiel de coupeur de brin, de bloquer l'action des polymérases ainsi que de mésappariement de base car les polymérases ont tendance à ajouter une adénine à l'opposé du site AP, ce qui est appelé la règle de A (Friedberg et al., 1995; Kunkel et al., 1983; Lawrence et al., 1990).

I.5.3 Processus de désamination

La désamination des bases se caractérise par la perte d'un groupement amino exocyclique à un site d'appariement de base par l'attaque de l'eau qui va le remplacer par un groupement carbonyle. Étant donné que ces groupements sont impliqués dans les pontages hydrogène, il est possible qu'une base apparaisse comme une autre pour les polymérases lors de la réplication et ainsi introduise une mutation. La désamination, de l'adénine donne l'hypoxanthine, de la guanine donne la xanthine, de la cytosine donne

l'uracile et la 5-méthylcytosine se désamine en thymine. La désamination de la cytosine à trois sources connues, la désamination thermique, la désamination enzymatique et la désamination provoquée par le stress oxydatif qui implique probablement les diols de dCyd.

I.5.3.1 Processus de désamination thermique

La désamination thermique de la dCyd est attribuée à la perte de son groupement amino de façon spontanée sans l'intervention d'agents extérieurs. La désamination thermique de la dCyd a été observée de deux façons soit par un test génétique qui détecte une transition C→U sur un plasmide incubé à des conditions physiologiques de pH (pH 7) et à 37°C ou d'effectuer une cinétique à différentes températures. Cette approche est hautement sensible et est capable de détecter une mutation unique, ce qui permet de tester les expériences à 37°C. Il est à noter que dans les modèles génétiques utilisés, le système de réparation uracil-DNA-glycosylase est inactif dans les bactéries hôtes et ainsi éviter qu'elles réparent la mutation. Le second système est réalisé à partir d'expériences de cinétique de formation 2'-désoxyuridine à pH 7 en fonction de la température et ce à des températures élevées dues au manque de sensibilité de la méthode. Dans les deux cas, il est possible à partir des cinétiques en fonction de la température d'estimer la vitesse de désamination à 37°C à l'aide des paramètres d'Arrhenius. Ces systèmes ont donc évalué que la désamination de la cytosine se produit à une vitesse de $2 \times 10^{-10} \text{ s}^{-1}$ * ($t_{1/2} = 110 \text{ ans}$) (Lindahl & Nyberg, 1974) pour le nucléoside libre, de $1 \times 10^{-10} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 220 \text{ ans}$) (Frederico et al., 1990) dans l'ADN simple brin (ADN sb) ainsi que $2.1 \times 10^{-10} \text{ s}^{-1}$ * ($t_{1/2} = 104 \text{ ans}$) (Ehrlich et al., 1986) et $7 \times 10^{-13} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 32\,000 \text{ ans}$) dans l'ADN double brin à

* Valeurs extrapolées à 37°C à partir d'expériences à plus hautes températures.

partir du model génétique de Frederico (Frederico et al., 1990) et sensiblement la même valeur de $2.6 \times 10^{-13} \text{ s}^{-1}$ * ($t_{1/2} = 85\,000$ ans) pour le modèle génétique de Shen (détecte les mutations C→T sur les sites méthylés) (Shen et al., 1994). Il a été estimé que de 100-500 désaminations de la cytosine se produiraient par jour dans chaque cellule humaine (Lindahl, 1993). À partir de ces données, il est possible de remarquer que le processus de désamination thermique est fortement influencé par la forme de laquelle la cytosine se retrouve, le nucléoside libre se désamine environ à la même vitesse que dans un polymère d'ADN simple brin et 140 fois plus rapidement qu'insérée dans un polymère double brin. Une telle stabilisation est aussi observée pour la 5-MedCyd qui a un taux de désamination thermique de $9.5 \times 10^{-10} \text{ s}^{-1}$ * ($t_{1/2} = 23$ ans) dans l'ADN sb (Ehrlich et al., 1986) et de $5.8 \times 10^{-13} \text{ s}^{-1}$ * ($t_{1/2} = 38\,000$ ans) (Shen et al., 1994) pour un facteur de stabilisation 1500 fois dans d'ADN double brin. Il a aussi été démontré que la désamination dans l'ADN db de la 5-MedCyd est de 2-3 fois plus rapide que pour la dCyd (Shen et al., 1994). Cette diminution du taux de désamination par la structure double brin de l'ADN oblige à distinguer les valeurs obtenues pour le nucléoside libre et celles obtenues dans un polymère double brin.

I.5.3.2 Induction enzymatique de la désamination

Trois processus connus de désamination enzymatique de la dCyd peut être accomplis soit par la AID "activation-induced deaminase", l'APOBEC ainsi que les ADN méthylases. L'AID est impliquée dans le processus de différenciation des anticorps en générant des désaminations aléatoires du dCyd dans l'ADN et de la Cyd dans l'ARN codant pour les anticorps à l'intérieur des lymphocytes B, un processus appelé hypermutation somatique (SHM). Le taux de mutation dans la région variable des

immunoglobulines est de 10^5 - 10^6 fois supérieur au reste du génome, ce qui indique une localisation plutôt qu'un effet global (Bhagwat, 2004). De plus, il semble que cette protéine ne soit exprimée uniquement dans les lymphocytes B et donc ne peut être impliquée que dans les désordres attribués aux lymphocytes B tels certains mélanomes (Neuberger et al., 2003). La famille des APOBEC est impliquée dans la formation des apolipoprotéines B et agit par désamination de la dCyd du mRNA dans des séquences spécifiques et ont aussi la capacité de désaminer la dCyd dans l'ADN, ce qui en fait un mutagène potentiel pouvant générer des transitions C→T (Harris et al., 2002). Les ADN méthylases servent à la méthylation de la cytosine dans les régions CpG, ce qui régule l'expression des gènes. Un niveau faible en S-adenosyl méthionine (SAM) S-adenosyl homosystéine (SAH), qui sont les donneurs du groupement méthyle, à pour effet que la cytosine activée dans le site catalytique de l'enzyme va plutôt accaparer un proton sur celle-ci et ainsi saturer la liaison double de la dCyd, ce qui va favoriser la réaction de désamination (Neuberger et al., 2003). Dans ce cas, le taux spécifique de mutation devrait augmenter uniquement au site CpG et expliquer aussi le taux de mutation à ces sites. Toutefois, cette réaction est complètement inhibée lorsque SAH ou SAM sont présentes (Gabbara & Bhagwat, 1995; Macintyre et al., 2001; Shen et al., 1992). Il faudrait des niveaux de SAM ou SAH soit 10 fois inférieurs à ceux physiologiques pour que le processus de désamination soit actif et des niveaux aussi faibles de SAM et SAH se traduiraient par une mort cellulaire (Lutsenko & Bhagwat, 1999; Wyszynski et al., 1994). Les deux premiers processus (AID et APOBEC) sont impliqués dans des types cellulaires particuliers et ne peuvent donc interagir sur un processus global impliquant tous les types cellulaires, tandis que le troisième (méthylation de l'ADN) ne peut se produire que dans

des conditions non-physiologiques et donc relié à une pathologie spécifique, donc ce type de désamination ne peut être qu'une source restreinte du spectre de mutations ponctuelles C→T observé dans plusieurs types cellulaires différents.

I.5.3.3 Désamination induite par le stress oxydatif

Les vitesses de désamination de la cytosine et de la 5-méthylcytosine sont fortement accélérées pour les produits d'oxydation de ceux-ci. Une étude sur l'oxydation induite par les radicaux hydroxyle sur la dCyd montrent que le produit majoritaire est le diol d'uracile pour un rendement d'environ 30% (Wagner et al., 1999), et ce pour des temps de réaction très courts et beaucoup moindres que les 110 ans nécessaires à convertir la moitié d'une solution de dCyd en dUrd de façon thermique. L'oxydation de la 5-MedCyd conduit aux quatre diastéréoisomères de diols de 5-MedCyd formés par la saturation du lien 5-6 et en plus de l'addition de deux fonctions alcools. Ces diols ne peuvent se décomposer que par désamination et être convertis en thymidine avec un taux moyen pour le nucléoside libre d'environ $9.9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ à 37°C et pH 7.4 (Bienvenu & Cadet, 1996). Si l'on compare le taux de désamination de la 5-MedCyd de façon thermique dans un ADN sb ($k = 9.5 \times 10^{-10} \text{ s}^{-1}$) à celui des nucléosides libres des diols de 5-MedCyd induits par l'oxydation, la différence est 1×10^5 fois plus rapide dans les résidus oxydés. Aucune donnée de vitesse de désamination des diols de 5-MedCyd dans l'ADN db n'a été publiée et donc ne permet pas de savoir, si comme dans le cas de la désamination thermique il y a stabilisation du produit à l'intérieur de l'ADN double brin. Un autre exemple de cette désamination se retrouve dans les produits d'oxydation par les UV sur la dCyd en milieu aqueux, les photohydrates. Les photohydrates produits lors de l'irradiation UV du dCyd et d'un poly dG-dC double brin se caractérisent par la saturation

du lien 5-6 induite. Cette saturation se produit par l'addition d'une molécule d'eau sur le lien 5-6 et donne une molécule (25) avec un groupement hydroxyle en position 6 et d'un hydrogène supplémentaire en position 5 (voir schéma 3). C'est photohydrates se décomposent principalement par déshydratation mais aussi faiblement par désamination de $\geq 10\%$ à 30% (Boorstein et al., 1990; Johns et al., 1965). Le taux de désamination d'un photohydrate de dCyd comme nucléoside libre est de $1.67 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (Johns et al., 1965) et dans un copolymère de dG-dC (ADN db) est de $5.6 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ à 37°C à pH 7.0 (Boorstein et al., 1990) pour une différence de réactivité d'environ 5-10 fois moindre dans l'ADN double brin que simple brin, ce qui est comparable à la stabilisation dans la désamination thermique. La formation de dimères pyrimidiques impliquant une cytosine, qui vont se lier de façon covalente par les liaisons 5-6 et ainsi saturé ce lien, vont désaminer à des taux de $3.8 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, donc 5×10^7 plus rapidement que la dCyd dans l'ADN double brin (Barak et al., 1995). Finalement, la désamination utilisant le bisulfite dans D_2O a aussi utilisé pour simuler ainsi la saturation du lien éthylénique 5-6, des échanges isotopiques sur le carbone 5 et montre bien l'implication et qu'il y a eu saturation et les taux de désamination observé à pH 5.8 et 37°C est de $7.4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (Iida et al., 1974; Sono et al., 1973). De plus, le spectre de mutation induit par le bisulfite dans un bactériophage est la transition C→T (Summers & Drake, 1971). Tous ces exemples montrent bien que la désamination est très fortement accélérée lorsque le lien 5-6 de la dCyd et 5-MedCyd est saturé et que les dommages induisant cette saturation sont probablement impliqués dans la mutagenèse.

I.6 La mutagenèse induite par les ROS

La mutagenèse est un événement tardif dans l'attaque par les radicaux libres sur l'ADN. Tout d'abord, il doit y avoir génération des radicaux libres qui seront capturés en grande majorité par le système d'antioxydant, une certaine quantité échappera à ce système et pourra migrer jusqu'à l'ADN et alors générer un dommage. Ce dommage, s'il n'est pas réparé, peut être fixé lors de la réplication et générer une mutation. Lorsqu'une polymérase rencontre un dommage sur l'ADN, elle peut être bloquée et dès lors le système de réparation interviendra pour réparer le dommage, sinon il y aura mort cellulaire. Elle peut aussi outre-passer le dommage en opposant une des quatre bases, dans le cas où une mauvaise base est ajoutée, il y aura alors mutation (voir figure 9) (Scharer & Jiricny, 2001; Wallace, 1998; Wallace, 2002). Ce sont les ponts hydrogène qui déterminent le couplage des nucléotides par les polymérases et donc les dommages pour être mutagènes doivent agir à ces sites soit par une désamination accélérée des bases, soit par la formation de tautomères plus stables. Malgré l'attaque aléatoire des ERO sur l'ADN, des sites plus sensibles qui impliquent la dCyd sont observés tels que : les sites CpG (Gan et al., 1999; Millar et al., 2002; Shen et al., 1994) ou CC (Reid & Loeb, 1993). De plus, la mutation prépondérante générée de façons spontanées ou bien induite par H₂O₂ ainsi que par les radiations ionisantes, est la transition GC→AT (Hatahet et al., 1994; Kreutzer & Essigmann, 1998; Purmal et al., 1994; Purmal et al., 1998; Wang & Essigmann, 1997; Wang et al., 1998). La base la plus sensible à l'oxydation par les ERO est la guanine pour former majoritairement la 8-oxo-7,8-dihydro-guanine, l'oxazolone ainsi que le résidu d'anneau fragmenté, la formamidopyrimidine (Fapy) (Cadet et al., 1999). Les expériences de mutagenèse in vivo sur la 8-oxo-7,8-dihydro-guanine montre

un spectre de mutation de tranversion GC→TA, l'oxazolone G→T (Bjelland & Seeberg, 2003; Klein et al., 1992; Klungland et al., 1999). Malgré la grande réactivité de la guanine face aux ERO, la cytosine apparaît comme le site le plus sensible à produire une lésion prémutagène (Wang et al., 1998).

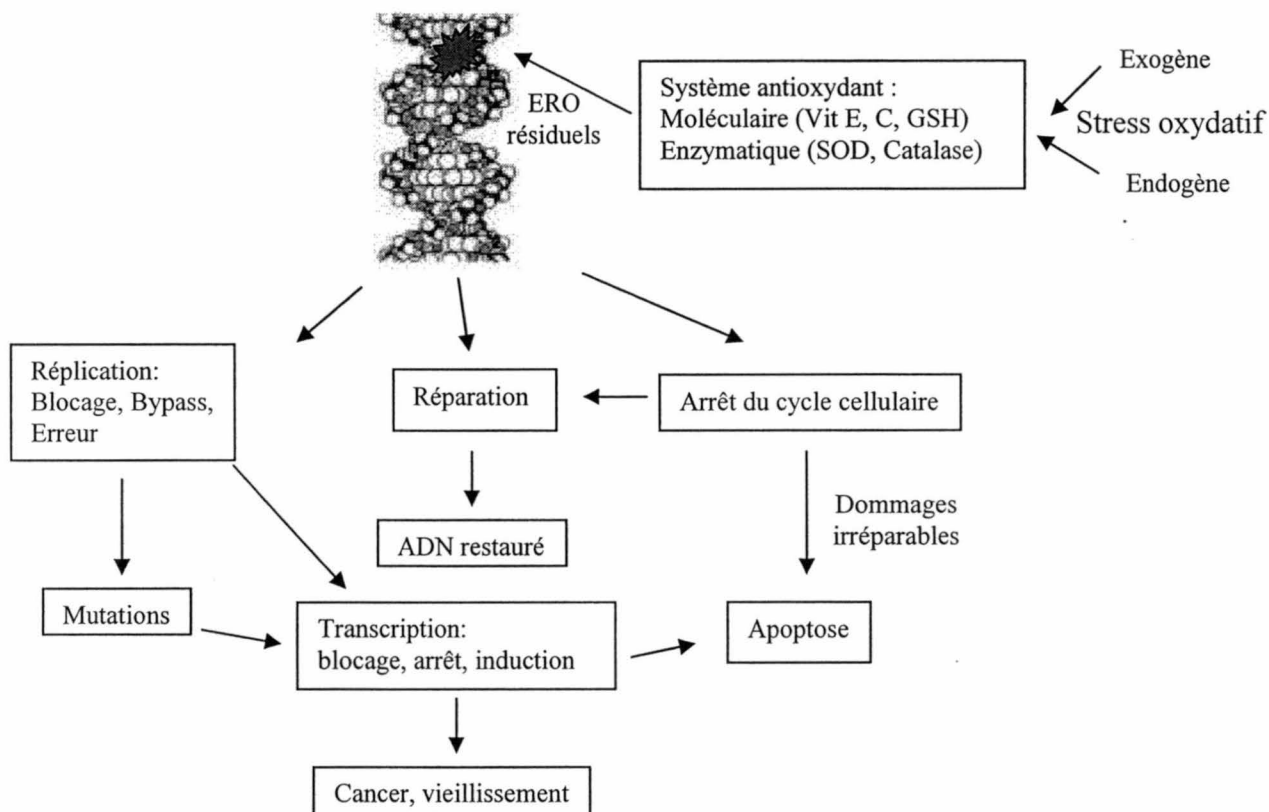


Figure 9. Représentation globale des interactions et les conséquences des ERO sur l'ADN cellulaire.

Des études ayant pour but la détermination du potentiel mutagène du diol de thymine dans un plasmide bactérien, celui-ci ayant été traité par un générateur spécifique de diols sur la liaison insaturée 5-6 des pyrimidines (l'osmium tetroxide (OsO_4)) et qui attaque préférentiellement la thymine (à moindre échelle la cytosine (1 :10)), ont montré un spectre de mutation composé majoritairement de transitions C→T dans une lignée

bactérienne *E. coli* (Hayes et al., 1988). Ainsi les produits d'oxydation sur la cytosine, probablement les diols de dCyd et/ou ces produits de décomposition, sont plus mutagènes que les diols de thymine (Hayes et al., 1988; Najrana et al., 2000). Une autre étude effectuée par l'équipe de Loeb, qui a impliquée la purification des produits d'oxydation de la dCTP avec lesquels des bactéries ont été incubées et ensuite isolées pour déterminer le spectre de mutation généré par ceux-ci. Une des fractions qui donnait des taux de mutation très élevés de 2.5 % avec un spectre C→T à été identifié par la suite comme étant la oh^5dCyd (Feig et al., 1994). Une autre étude portant sur le potentiel mutagénique de certaines bases modifiées de la dCyd issues de la décomposition des diols de dCyd (schéma 2), soit les diols de 2'-désoxyuridine (5,6-dihydroxy-5,6-dihydro-2'-désoxyuridine), le 5-hydroxy-2'-désoxycytidine (oh^5dCyd) et le 5-hydroxy-2'-désoxyuridine (oh^5dUrd) a montré des fréquences de mutations respectives de 80, 83 et 0.05% et donnent majoritairement des transitions C→T. La stratégie de cette étude consistait à introduire individuellement chacun des trois dommages dans un génome viral M13mp7L2 simple brin pour être transfecté et répliqué dans *E. coli*, les résultats obtenues démontrent que ces dommages sont de bons candidats au spectre de mutations observés de façon spontanée ou induit par les ERO (Kreutzer & Essigmann, 1998). En raison de l'instabilité très grande des diols de dCyd, l'effet des radicaux sur la dCyd ont été attribués à ses produits de décomposition, le diol de dUrd, le oh^5dUrd et le oh^5dCyd . Toutefois l'étude de Loeb laisse présager que le dommage introduit par la cellule était peut-être les diols de dCyd puisqu'il ne pouvait discerner du oh^5dCyd à cause de la méthode d'analyse utilisée (CG-SM) qui convertissait à 100 % les diols de dCyd en oh^5dCyd . Toutes ces expériences suggèrent que les produits de décomposition de la dCyd

jouent un rôle important dans la mutagenèse mais aussi que les diols de dCyd joueraient peut-être un rôle autre que d'être simplement un précurseur.

Les sites CpG qui représentent plus de 80% des sites méthylés de l'ADN et sont très sensibles au stress oxydatif. Le taux de désamination thermique du 5-MedCyd n'est pas assez élevé pour expliquer l'hypermutableté des sites CpG (Jones et al., 1992). Les sites impliquant la 5-MedCyd sont donc désignés comme des points chauds de l'ADN puisqu'ils ne représentent que 3-5% de la quantité de cytosine dans l'ADN de mammifères et jouent un rôle de régulation dans l'activité de certains gènes (Coulondre et al., 1978; Pfeifer, 2000). Pour comprendre l'importance de la désamination de la 5-MedCyd dans les sites CpG, il est important de comprendre le processus d'inhibition de la transcription par la méthylation dans ces sites CpG. Lorsque ces sites sont méthylés la transcription est inhibée et donc le gène est silencieux. Différentes hypothèses sur l'inhibition de la transcription par la méthylation des sites CpG ont été étudiées. Il est possible que parce que la 5-MedCyd se retrouve dans le sillon majeur de l'ADN (Tate & Bird, 1993) et possiblement interférer avec les facteurs de transcriptions (Kass et al., 1997). Une autre hypothèse serait que les protéines liant comme, les protéines méthyles CpG (MECP) rapatrient les déacétylases qui déacétylent les histones (Jones et al., 1998). L'acétylation des histones est associée à un gène actif (Wolffe, 1996). Et finalement l'association de certaines protéines comme les MDBP (methylated DNA binding protein) empêcherait l'association des facteurs de transcription sur l'ADN (Jost & Hofsteenge, 1992). La désamination induite par un stress oxydatif induisant la saturation de la liaison 5-6 de la 5-Methyl-cytosine entraîne une substitution de base qui se traduit par une transition C→T et ces nouveaux sites (TpG) ne seraient plus en mesure de rapatrier les

MECP et MDBP et ainsi un gène silencieux deviendrait actif ce qui expliquerait la sensibilité de ces sites au stress oxydatif.

Les sites CC sont aussi très sensibles aux ERO et donnent des transitions CC→TT, la désamination thermique ne peut expliquer ces transitions à elle seule, car la probabilité que deux désaminations thermiques se produisent sur deux cytosines voisines pour un temps court est presque nulle, seule une accélération de la désamination par l'induction d'un agent, ici les ERO, peut expliquer ce résultat (Reid & Loeb, 1993).

I.7 Le système de réparation de l'ADN

Le système de réparation de l'ADN agit comme dernière ligne de défense contre les ERO. L'ADN endommagé par les radicaux libres peut être localisé dans deux compartiments cellulaires différents chez les mammifères à savoir le noyau et les mitochondries. Dans l'ADN nucléaire, en raison du type de dommage rencontré, cinq processus distincts sont alors possibles soit : la réparation directe, la réparation par reconnaissance de

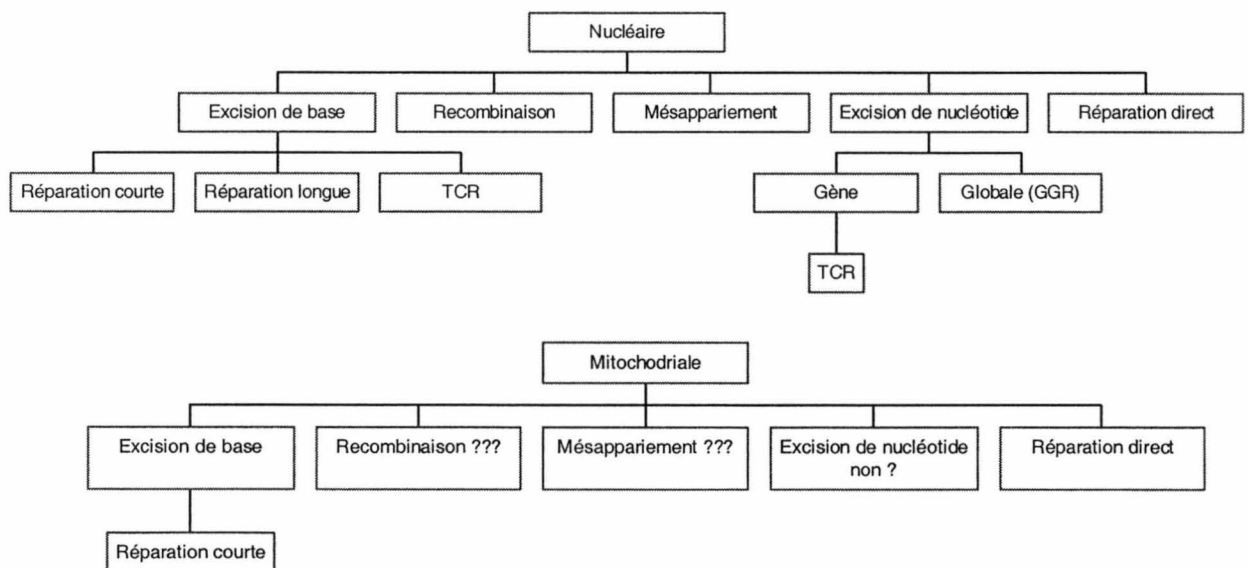


Figure 10. Représentation de la réparation dans une cellule eucaryote, adaptée de (Bohr, 2002)

mésappariement de base, la réparation par recombinaison, la réparation par excision de nucléotides et finalement la réparation par excision de base (voir la figure 10). L'étude de ces différents mécanismes est rendue plus complexe par la diversité entre les espèces animales et le rôle des protéines responsables à la réparation (Bohr, 2002; Izumi et al., 2003). Souvent elles ont une homologie entre les différents organismes dans la séquence des acides aminés qui les constituent ainsi qu'une homologie de substrat et sont donc dites homologues tel hNth (chez l'homme) et endo III (chez *E.coli*). Cette conservation à travers l'évolution biologique peut indiquer l'importance de protéger l'organisme contre les ERO. D'autres enzymes de réparation n'ont qu'une homologie de fonction entre les différents organismes parce qu'elles ont les mêmes substrats, mais non pas ou peu d'homologie dans la séquence d'acide aminé et sont dites orthologues, tel Fpg (chez *E.coli*) et hOgg1 (chez l'homme).

La réparation directe est observée essentiellement pour les dimères pyrimidiques et les photoproduits (6-4), qui sont induits par les radiations UV. Ces dommages sont réparés respectivement par une CPD photolyase et une 6-4 photolyase qui régénèrent les bases en coupant le lien covalent formé entre celles-ci (Carell et al., 2001; Yu et al., 1999).

La réparation de mésappariement, est surtout observée lors de la réplication elle consiste à réparer les erreurs produites par les polymérases lors de l'élongation tel un mésappariement AG ou TC qui implique des gènes tel Mut L et S chez *E. coli*. et les hPMS1-2, hMLH1 ainsi que hMSH1-3 chez l'homme (Slupphaug et al., 2003; Yu et al., 1999).

La réparation par recombinaison se divise en deux sous-groupes : homologue et le rejoindement de bout d'ADN. La recombinaison homologue est un processus qui implique le transfert d'information avec le chromosome homologue et qui est hautement fidèle à la copie originelle et implique des gènes dans la famille des Rec (A,B,C,D) pour *E. coli* (Alberts et al., 1994) et RAD (50,51,52,54) chez *S. cerevisiae*. (Slupphaug et al., 2003). Ce type de réparation est lié à la réparation des dommages très délétères tel les cassures doubles, où la polymérase n'a plus de matrice de polymérisation. Il a le net avantage de restaurer un gène actif provenant de la copie d'un autre allèle. Ce processus est aussi responsable de la diversité biologique car il est hautement actif dans les gamètes et permet les échanges de variantes des gènes entre les régions homologues des chromosomes. La réparation non homologue par regroupement d'extrémité (NHEJ) est présente chez les mammifères et ont aussi pour fonction de réparer les cassures double brin. Les protéines impliquées sont Ku 70 et Ku 80 qui reconnaissent et lient les bouts d'ADN libres et rapatrie la protéine kinase d'ADN (DNA-PK) qui ré-associent les premières séquences homologues retrouvées et coupes les bouts libres. Ce processus résulte en une délétion d'une partie de l'ADN ainsi réparé, ce qui comporte certains risques si elle se trouve dans un gène actif tel un supresseur de tumeur, toutefois dans la plupart des cas, l'effet est bénéfique car il en résulte la sauvegarde du bout de chromosome sectionné et la survie cellulaire (Essers et al., 2000; Yu et al., 1999).

La réparation par excisions de nucléosides (NER) est surtout observée pour de dommages volumineux déformant la double hélice comprenant des dimères intrabrin tel ceux de pyrimidines induits par le rayonnement UV ou des adduits avec des hydrocarbures aromatiques polycycliques (de Boer & Hoeijmakers, 2000). La NER se

divise à son tour en deux groupes : la réparation globale du génome (RGG) et la réparation couplée à la transcription de gènes (TCR) (Yu et al., 1999). La réparation globale du génome s'effectue à l'intérieur même des nucléosomes très compacte et permet l'élimination des dommages sans distinction des deux brins d'ADN contrairement au TCR qui se produit dans une 'zone plus relâchée' et qui initie la réparation seulement dans le brin transcrit. Les enzymes de la RGG sont formés d'un premier complexe composé de HHR23B et XPC (lié à la pathologie xeroderma pigmentosum de type C) et la TCR le complexe RNAPol II et CSB (retrouvé dans la pathologie du syndrome de cocaïne) tous deux sont distinctivement impliqués dans la reconnaissance du dommage. Par la suite le processus est commun en rapatriant le facteur TFIIH (lié à la transcription et à la réparation Uvr ABC), XPA, XPB, XPD (lié à la maladie xeroderma pigmentosum de type respectivement A,B,D) et RPA (protéine liant l'ADN pour la rendre linéaire), ce complexe permet alors de séparer les deux brins sur une longueur de 25 à 30 nucléotides et rapatrier le complexe ERCC1/XPF et XPG qui vont couper de 25 à 30 nucléotides en amont et en aval sur le brin d'ADN ayant le dommage. Une ADN polymérase synthétise le brin complémentaire et une ligase lie le lien phosphodiester pour régénérer la double hélice. Le REN nécessite une longue matrice intacte en raison de la dimension du fragment retiré, ce qui peut être difficile après le passage d'un rayonnement ionisant laissant un chemin d'ionisation et générant des "cluster" dommages (Slupphaug et al., 2003; Yu et al., 1999).

La réparation par excision de bases (BER) est la plus impliquée dans le domaine de la réparation des modifications chimiques liées à une seule base issue entre autres du stress oxydatif, (Bjelland & Seeberg, 2003; Wallace, 1998; Wang et al., 1998; Wood et

al., 2001). Par exemple, il est estimé que 80% des diols Thd sont réparés par le processus BER et environ 25% par NER (Dianov et al., 2000). Ce processus est demeuré hautement conservé à travers l'évolution (Scharer & Jiricny, 2001). La première étape consiste en la reconnaissance du dommage par des enzymes spécifiques appelées glycosylases qui coupent le lien glycosidique qui relie la base modifiée au sucre et ainsi libère la base endommagée pour laisser un site apurinique et apyrimidique (AP) (voir figure 11). La deuxième étape consiste à couper le site AP par une AP lyase qui coupe en 3' le lien phosphodiester pour engendrer un aldéhyde $\alpha\beta$ insaturé du côté 3' et causer une coupure simple brin du lien phosphodiester. Certaines glycosylases possèdent une activité endonucléase ou lyase en 5' ou 3'. Nth qui est responsable de la réparation des

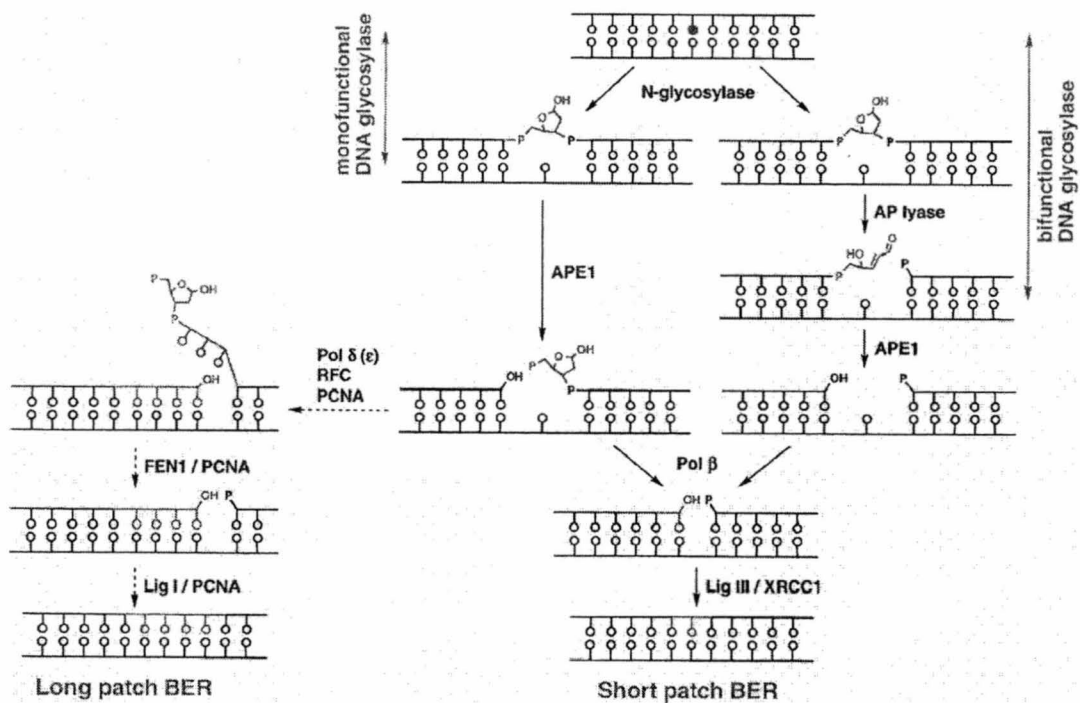


Figure 11. Les différents types de réparation par excision de bases (Ide & Kotera, 2004)

pyrimidines oxydées (Cadet et al., 2000; Dizdaroglu et al., 1999; Karahalil et al., 1998; Wallace, 1998; Wallace, 2002), possède une activité β -lyase qui coupe en 3' (Kow & Wallace, 1987), toutefois le processus exact ne semble pas si certain et reste à éclaircir (Bailly & Verly, 1987; D'Ham et al., 1999). En raison que la coupure soit fait en 3' ou en 5', une désoxyribophosphodiesterase ou bien une 5' AP endonuclease coupe du côté opposé pour générer un trou avec un groupement hydroxyle 3' nécessaire à l'élongation par les polymérases. Certaines glycosylases, comme Fpg et endo VIII, ont une activité $\beta\delta$ lyase qui enlève complètement le site AP et laisse un groupement 3'-phosphate qui est ensuite éliminé. La troisième étape consiste à remplacer la base manquante par une polymérase et l'étape finale nécessite une ligase qui recrée le lien phosphodiester. Le BER se divise en deux groupes: la réparation courte et la réparation longue. La réparation dite courte, ne génère qu'un trou d'un nucléotide et implique la polymérase β . La réparation dite longue, génère des trous de 2-6 nucléotides (Frosina et al., 1996), et nécessite le PCNA (proliferating cell nuclear antigen) ainsi que la polymérase δ ou ϵ (Fortini et al., 1999; Ide & Kotera, 2004; Scharer & Jiricny, 2001). Il semble que le processus de BER soit plus rapide dans les brins transcrits comparés à ceux non transcrits (Grishko et al., 1997; Leadon & Cooper, 1993; Leadon & Lawrence, 1991). La figure 12 est une représentation de la formation et réparation par endo III des diols sur la 5-MedCyd qui est similaire à la formation et réparation des photohydrates dCyd ou endo III coupe la lien glycosidique pour libérer la base dans le milieu et est suivi par un coupure du lien phosphodiester et probablement comparable aux diols de dCyd.

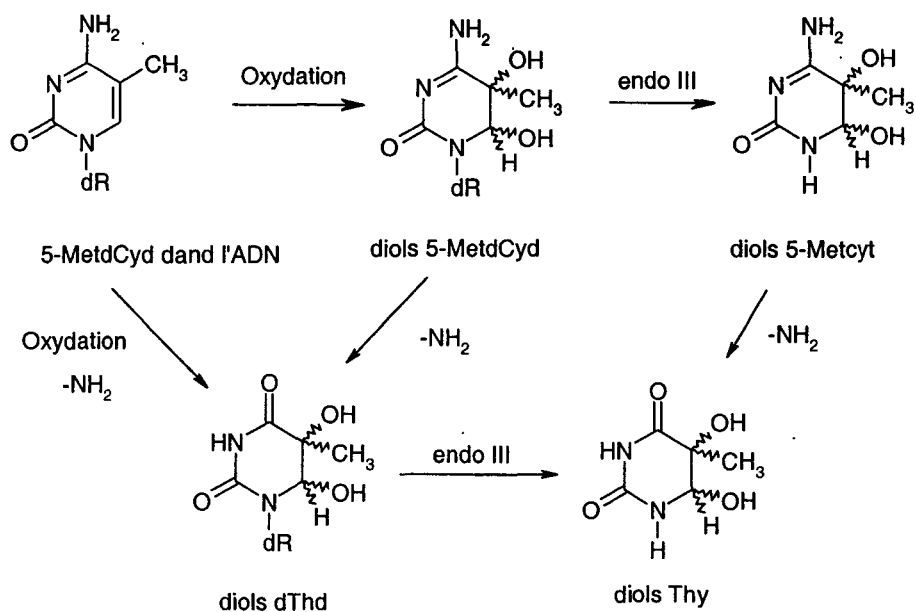


Figure 12. Formation et réparations des diols de 5-MedCyd dans l'ADN (Zuo et al., 1995).

1.8 Description du projet de recherche

L'hypothèse de travail repose sur l'idée que les dommages d'oxydation de la cytosine sont impliqués dans la mutagenèse soit par une désamination accélérée soit par formation de tautomères ou mésappariement lors de la réplication et que s'ils ne sont pas réparés avant la réplication, ils vont conduire à une mutation C→T (figure 12).

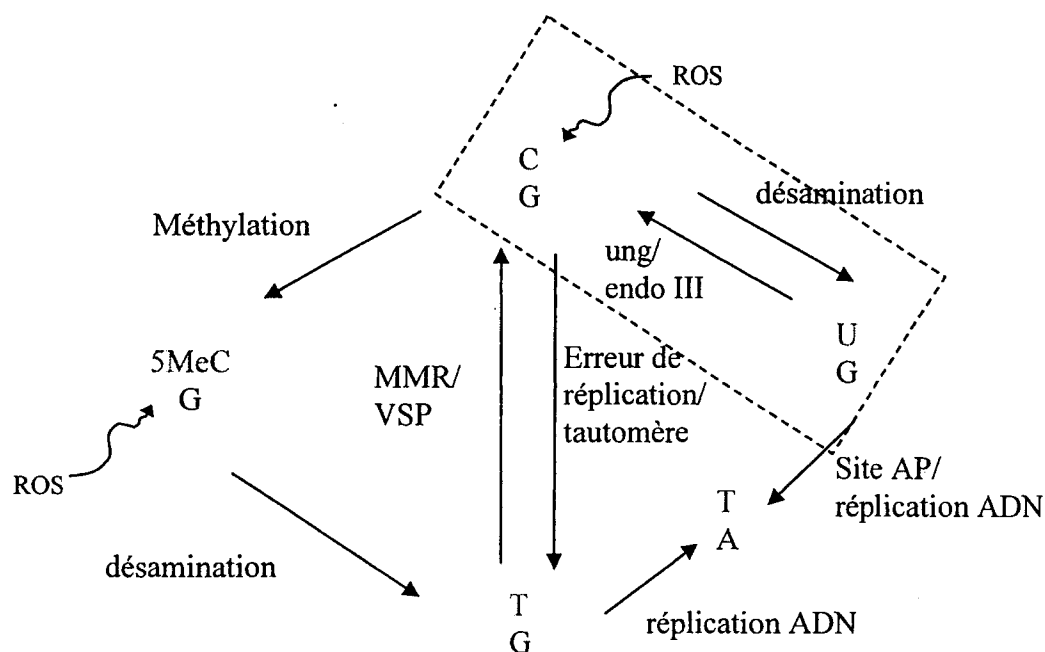


Figure 13. Effet cellulaire de l'oxydation par les ERO de la dCyt

Les produits majoritaires d'oxydation de la dCyt étant les diols de dCyt, nos efforts ont donc visé à comprendre ses processus de décompositions et ainsi que sa réparation dans l'ADN. Des études sur les photohydrates de dCyt, produits très similaires aux diols de dCyt, ont démontré qu'ils sont stabilisés dans l'ADN double brin, donc suppose que les diols de dCyt le sont aussi et donc avoir un temps de vie assez long dans l'ADN double brin pour envisager une implication biologique. Les études sur les photohydrates de dCyt

généérés dans un poly dG-dC irradié aux UV ont montré qu'ils étaient excisés par endo III. Endo III, qui est responsables de la réparation des pyrimidines oxydées telles les diols Thd, la oh^5dUrd , les diols de dUrd, la oh^5dCyd et plusieurs autres bases oxydées, sera donc utilisée pour évaluer l'excision des diols de dCyd dans un ADN oxydé (Bjelland & Seeberg, 2003; Dianov et al., 2000; Hatahet et al., 1994). Finalement, la formation des diols de dCyd par l'action du radical hydroxyle sur la dCyd, passe par un intermédiaire hydroperoxyde ce qui nous a poussé à isoler et caractériser ces produits de décomposition dans notre dernière étude.

La première étude qui constitue le premier article, aborde l'aspect de la stabilité du diol de dCyd comme nucléoside libre en fonction de différents paramètres tels : le pH, la concentration de sel et sont temps de demi-vie dans un polymère d'ADN. L'approche utilisée consiste à former les bromohydrines de dCyd par la réaction bien connue de l'ajout de brome à une solution aqueuse pour former le BrOH qui va s'additionner sur la liaison double en position 5-6 du dCyd pour former les deux diastéréoisomères trans de bromohydrines. Une séparation CLHP permet de recueillir chacune des deux bromohydrines individuellement. Ces bromohydrines sont ensuite transformés en diols de dCyd par l'ajout d'oxyde d'argent. Quatre diastéréoisomères possibles sont ensuite séparés par CLHP. Cette méthode de formation de diols a déjà largement été utilisée dans la formation des diols de thymidine (Wagner et al., 1994), de 2'-désoxyuridine (Cadet et al., 1979) et de 5-MedCyd (Bienvenu & Cadet, 1996). Les diols de dCyd ont ensuite été générés in vitro dans un ADN de thymus de veau et incubés à pH 7 et 37°C pour suivre leur cinétique de décomposition. Une méthode CLHP couplée à un système électrochimique a été développée pour étudier la décomposition des diols.

La deuxième phase consistait à évaluer l'efficacité d'excision des diols de dCyd par endo III dans un polymère d'ADN. La grande diversité des dommages générés par les radicaux hydroxyle nous a conduit à développer un modèle générant spécifiquement les diols de dCyd afin d'éliminer la compétition d'endo III avec d'autres produits d'oxydations des pyrimidines tel le diol de thymine. Un poly dG-dC, comme dans le cas des phothyrates, a été utilisé avec le KMnO_4 comme générateur spécifique de diols de dCyd. Ce système comporte un double avantage, le KMnO_4 est peu réactif avec les purines (Bui & Cotton, 2002; Nawamura et al., 1994) et produit une double hydroxylation vicinal sur les liaisons éthyléniques (Wiberg & Saegebarth, 1957) pour former directement le diol de dCyd. Le choix d'un hétéroduplexe poly dG-dC ou d'un hétéroduplexe poly dI-dC et ce parce que la thymine est plus réactive avec KMnO_4 que la cytosine, cette réaction conduisant à la formation des diols de thymine.

Les études de radiolyse pulsée ont démontré que le radical le plus formé sur la dCyd suite à l'attaque par le radical hydroxyle suivi d'une addition d'oxygène est le 5-hydroxy-5,6-dihydro-2'-désoxycytidin-6-yle (4) (schéma 1) qui se transforme en 5-hydroxy-6-hydroperoxy-5,6-dihydro-2'-désoxycytidine (6) qui est un des précurseurs des diols de dCyd. La dernière étude consiste à générer le 5-hydroxy-6-hydroperoxy-5,6-dihydro-2'-désoxycytidine en deux étapes par la formation de la bromohydrine suivit d'une conversion H_2O_2 assistée par Ag_2O . Les produits sont ensuite séparés par CLHP et analysés par RMN ^1H , ^{13}C , COSY et NOESY. L'avantage de ce système est de générer directement l'hydroperoxyde sans passer par les formes radicalaires et, de plus, d'éviter la présence de métaux de transitions nécessaires à la réaction de Fenton qui vont rapidement réduire les hydroperoxydes en diols.

Chapitre II – Premier article

2'-Deoxycytidine Glycols, a Missing Link in the Free Radical-mediated Oxidation of DNA

Sébastien Tremblay, Thierry Douki, Jean Cadet, and J. Richard Wagner

Journal of Biological Chemistry 274(30): 20833-20838; 1999

Chapitre III – Deuxième article

Efficient excision of cytosine glycols from oxidized poly(dG-dC) and poly(dI-dC) by endonuclease III

Sébastien Tremblay and J. Richard Wagner

Nucleic Acids Research: soumis le 15 mai 2004

Efficient excision of cytosine glycols from oxidized poly(dG-dC)
and poly(dI-dC) by endonuclease III

Sébastien Tremblay and J. Richard Wagner*

Department of Nuclear Medicine and Radiobiology, University of Sherbrooke, Sherbrooke (Quebec) Canada J1H 5N4, and the Research Center of Aging, Sherbrooke University Geriatrics Institute, 1036 Rue Belvedere Sud, Sherbrooke (Quebec) Canada J1H 4C4.

Corresponding author:

Prof. J. Richard Wagner,
Research Center of Aging, Sherbrooke University Geriatrics Institute, 1036 Rue Belvedere Sud,
Sherbrooke (Quebec) Canada J1H 4C4.
Phone: (819) 821-1170 ext. 2286
Fax: (819) 829-7141
Email: Richard.Wagner@Usherbrooke.ca

Key Words: Oxidative DNA damage, base excision repair, KMnO_4 , 5-hydroxycytosine, 5-hydroxyuracil, uracil glycols, deamination, dehydration, HPLC/EC, GC/MS.

Running Title: Formation and repair of cytosine glycols

ABSTRACT

Cytosine glycols (5,6-dihydroxy-5,6-dihydrocytosine) are initial products of cytosine oxidation in DNA. Because these products are not stable, virtually all biological studies have focused on the stable oxidation products of cytosine, including 5-hydroxycytosine, uracil glycols, and 5-hydroxyuracil. Previously, we showed that the lifetime of cytosine glycols was greatly enhanced in double stranded DNA, thus implicating these products in DNA repair and mutagenesis. In the present work, cytosine and uracil glycols were generated in double stranded alternating co-polymers by oxidation with KMnO_4 . The half-life of cytosine glycols in poly(dG-dC) was 6.5 h and deamination represented about 1/5 of the total decomposition. The excision of cytosine glycols from poly(dG-dC) by purified endonuclease III was comparable to the excision of uracil glycols, whereas both substrates were excised 5-fold more efficiently than 5-hydroxycytosine. 5-Hydroxyuracil was not directly formed in polymers by oxidation with KMnO_4 and uracil glycols did not undergo dehydration to 5-hydroxyuracil in oxidized polymers. The excision of uracil glycols from oxidized polymers led predominantly to the release of cis uracil glycols. The results for poly(dI-dC) were similar to those for poly(dG-dC). This work underlines the importance of cytosine glycols in base excision repair.

INTRODUCTION

Reactive oxygen species are constantly generated by endogenous processes, such as aerobic respiration, phagocytosis, and by exposure to ionizing radiation (1,2). The reaction of H_2O_2 with DNA bound metal ions, such as Fe^{2+} or Cu^+ , appears to be a major source of endogenous oxidative DNA damage (3). In cellular DNA, the formation of oxidative DNA damage is counterbalanced by repair, involving an array of DNA repair enzymes, which maintain a low steady state level of damage. About 40 individual oxidative damages have been characterized so far, not including isomers, and 10 of these modifications have been detected in cellular DNA (4-6). Using methods that minimize artifactual oxidation, the number of oxidative hits per cell per day has been estimated to be 500,000 based on the rate of repair of 8-oxo-7,8-dihydroguanine and the steady state levels of this lesion in mouse brain tissue (7). Thus, oxidative damage appears to be much greater than other endogenous processes, such as depurination, alkylation and thermal deamination of cytosine, underlining its potential as a formidable contributor to spontaneous mutagenesis (1,8,9).

The major stable products of hydroxyl radical induced oxidation of 2'-deoxycytidine include the nucleoside derivatives of 5-hydroxycytosine and uracil glycols (~ 40%) (10). These products arise from thermal decomposition of intermediate cytosine glycols, the initial products of radical mediated cytosine oxidation. Previously, we showed that the stability of cytosine glycols was enhanced 34-fold in oxidized calf thymus DNA compared to the free nucleoside and that the main products of decomposition included 5-hydroxycytosine (70%) and uracil glycols (30%) (11). These results have two major implications with respect to mutagenesis. Firstly, the relatively long lifetime of cytosine glycols in DNA indicates that these lesions will participate in processes such as DNA replication and repair. In addition, the pathway of decomposition for

cytosine glycols involving either dehydration or deamination represents a critical step in mutagenesis. On one hand, the dehydration pathway gives weakly mutagenic lesions, i.e., 5-hydroxycytosine. For example, the specific incorporation of 5-hydroxycytosine into M13 led to a relatively low frequency (0.05%) of mutations (C to T transitions) in host *E. coli* (12); however, the mutagenic potency of this lesion depends on sequence context (13). On the other hand, the deamination pathway gives highly mutagenic lesions, i.e., uracil glycols and 5-hydroxyuracil. This pathway leads to the loss of the exocyclic amino group of cytosine, which is involved in base pairing in duplex DNA; thus, the modified base has a high probability of miscoding during DNA polymerization. Indeed, A is predominantly inserted opposite uracil glycols and 5-hydroxyuracil by DNA polymerases giving rise to a high frequency (~80%) of mutations (C→T transitions) in host organisms (12-14).

The bias toward GC to AT transitions in mutation spectra of spontaneous, H₂O₂ or radiation induced mutations in mammalian cells (15-17) suggests that damage to C residues has a relatively high tendency to convert to mutations (18,19). The importance of cytosine oxidation in mutagenesis is demonstrated by the effects of osmium tetroxide (OsO₄), which predominantly oxidizes T and to a minor extent C in DNA, but induces only GC to AT transitions when oxidized DNA is incorporated into *E. coli* for mutational analysis (20,21). Interestingly, within the spectra of GC to AT transitions, there is a relatively high frequency of mutations at methylated CpG sites (19,22,23). Although the reason for this bias is not clear, a simple explanation would be that intermediate 5-methylcytosine glycols can not undergo dehydration because of the presence of a methyl group at C5, forcing these glycols to decompose via deamination to potentially mutagenic lesions (24).

The biological consequences of cytosine glycols are difficult to assess. Although cytosine glycols are relatively stable in double stranded DNA, they rapidly decompose to 5-hydroxycytosine and uracil glycols when DNA is broken down into its components (11). Thus, it is not possible to directly monitor cytosine glycols in DNA by standard methods involving enzymatic digestion and HPLC/EC or GC/MS analyses. In this work, we have developed several methods to study cytosine glycols in DNA using alternating heteroduplexes poly(dI-dC) and poly(dG-dC) using KMnO_4 as an oxidizing agent. Subsequently, the excision of cytosine and uracil oxidation products by endo III was determined using freshly oxidized polymers, which contained mostly cytosine glycols, and heat-treated polymers, in which cytosine glycols were transformed into 5-hydroxycytosine. These analyses demonstrate that endo III excises cytosine glycols from oxidized polymer with an efficiency that is comparable to that of uracil glycols but much greater than that of 5-hydroxycytosine.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Water was prepared by double distillation in glass followed by passage through a water purification system (resistivity = 18.3 MΩ/cm; EASY pure, Barnstead). Chemicals were of the highest available purity. Sodium chloride (NaCl), potassium permanganate (KMnO₄), sodium metabisulfite (Na₂O₅S₂), sodium hydroxide (NaOH), and formic acid (CH₂O₂) 88% were purchased from Fluka; bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) with 1% trimethylchlorosilane (TMCS) were purchased from Supelco, EDTA was purchased from Sigma; phosphoric acid 88%, cytosine, guanine were obtained from Aldrich; and the alternating heteroduplexes poly(dG-dC)) and poly(dI-dC)) from Amersham Pharmacia Biotech. Purified endo III was kindly provided by Serge Boîteux (CEA, France).

Acid hydrolysis and GC/MS

All operations were carried out in silicon capped glass vials (300 µl), which were sealed under an atmosphere of nitrogen between steps. Acidic hydrolysis was achieved by heating polymers for 40 min at 145°C in 100 µl of 88% formic acid. Samples were then dried under vacuum using a speed-vac apparatus (Savant). The corresponding trimethylsilyl derivatives of DNA bases were obtained by derivatization at 120°C for 25 min using a 1:3 mixture (total volume = 50 µl) of anhydrous acetonitrile and BSTFA containing 1% TMCS. The analysis of modified bases was carried out by GC/MS (Model QP5050A, Shimadzu) equipped with a 0.25 mm x 30 m XTI-5 column (Restek) with helium as carrier gas at a flow rate of 2 ml/ml. The initial temperature of the column was set at 125°C for 2 min and it was increased at a rate of 5.2 °C/min for 30 min and then held at 280°C for an additional 12 min. The temperature of the injector and detector were 250°C and 280°C, respectively. Ionization was carried out by collision with 70 eV

electrons. Authentic standards of 5-hydroxycytosine and 5-hydroxyuracil were prepared by an established method (25). Stable isotopes (+3 amu) of *cis* and *trans* uracil glycols, 5-hydroxycytosine, 5-hydroxyuracil were prepared from $^{15}\text{N}_2^{13}\text{C}$ -labeled urea (Cambridge Isotopes), as previously described (26,27)

Acid hydrolysis and HPLC/EC

The same acid hydrolysis protocol was used for HPLC/EC and GC/MS analysis (see above). HPLC analysis of modified nucleobases was performed on a dual pump HPLC (Model 616, Waters) with a solvent controller (Model 600S, Waters), attached to an automated injector (Model 717 plus, Waters), PDA detector (Model 996, Waters), and an electrochemical detector (Coulochem II Model 5200, ESA Associates) equipped with an electrochemical cell (Model 5011, ESA). Data was acquired using an AD converter (SAT/IN, Waters). HPLC and data acquisition was controlled by Millenium software (Version 3.2, Waters). For the separation of modified nucleobases, we used a 0.6 x 25 cm C18 ODS-AQ column (YMC) at a flow rate of 1.2 ml/min with a mixture of sodium phosphate (25 mM) and sodium acetate (2.5 mM) at pH 5.5 as the mobile phase. 5-Hydroxycytosine and 5-hydroxyuracil, were detected at the first electrode (75 mV versus Pd reference) and second electrode (350 mV) of the electrochemical detector, respectively. The yield of damage was calculated as a ratio of 5-hydroxycytosine or 5-hydroxyuracil given by electrochemical detection to non-modified cytosine, which was determined by UV detection at 260 nm on the same chromatographic run.

Enzymatic hydrolysis and HPLC/EC

Polymers were hydrolyzed to a mixture of nucleosides by enzymatic digestion. Ten μg of oxidized polymers were incubated at 50°C for 30 min with 5 units of P1 nuclease (Roche) in 40

μl of 10 mM sodium acetate (pH 4.8). Following digestion with P1 nuclease, the pH of the solution was adjusted to pH 7 by the addition of 5 μl of 1.2 M ammonium acetate and 5 units of alkaline phosphatase (Roche) was added to hydrolyze the phosphate group. Protein was removed from the sample by the addition of 50 μl of chloroform. The sample was analyzed by HPLC using a 0.6 x 25 cm C18 ODS-AQ column (YMC) at a flow rate of 1.2 ml/min and 25 mM sodium phosphate (pH 5.5) plus 2.5 mM sodium acetate as the mobile phase. 5-Hydroxy-2'-deoxycytidine and 5-hydroxy-2'-deoxyuridine were quantitated using the electrochemical detector with a window of oxidation of between 50 and 350 mV (Model 5011, ESA). As described above for nucleobases, the yield of damage was normalized to the amount of non-modified 2'-deoxycytidine obtained by UV detection at 260 nm.

Oxidation of polymers by KMnO_4

The standard procedure for the oxidation of poly(dG-dC) and poly(dI-dC) involved the addition of KMnO_4 (final concentration = 1-5 mM) to a solution of polymer (0.2 μg/μl; 1 absorbance unit = 50 μg/ml) containing sodium phosphate buffer (25 mM; pH 3-10) and NaCl (0-3 M). The reaction was allowed to proceed at room temperature for specific times (0-4 h). It was terminated by the addition of $\text{Na}_2\text{O}_5\text{S}_2$ (2 equivalents) followed by the addition of NaCl (0.5 M) and then isopropanol (50% v/v) to precipitate the polymer. For precipitation, the samples were kept at -20°C for 30 min prior to centrifugation at 13,200 g at 4°C for 40 min. The pellets were subsequently dissolved in 25 μl of water and dialyzed overnight against 4 L of water at 4°C. Dialysis was carried out using a microdialyzer apparatus (Spectra/Por 16 wells, Septrum) equipped with 12000-14000 MWCO regenerated cellulose membranes (Spectra/Por). The membranes were prepared by boiling them in water containing 1 mM EDTA and 2% bicarbonate for 10 min followed by extensive washing with water and 1 mM EDTA.

Excision of cytosine products by endo III

Poly(dG-dC) and poly(dI-dC) (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) were oxidized by exposure to 1 mM KMnO_4 in a solution of 2 M NaCl for 2 h. The reaction was terminated by the addition of 2 mM EDTA (final concentration) plus 2 equivalents of $\text{Na}_2\text{O}_5\text{S}_2$. The pellets were subsequently dissolved in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl and 1 mM EDTA) and dialyzed overnight against 4 L of water at 4°C (as above). The polymers were divided into two fractions: one fraction was stored at -20°C to preserve the amount of cytosine glycols, denoted as freshly oxidized polymer; and the other fraction was incubated at 37°C in 10 mM Tris-Cl (pH 7.0), 100 mM NaCl and 1 mM EDTA for 4 days to completely transform cytosine glycols into 5-hydroxycytosine, denoted as heat-treated polymer. Enzymatic excision of cytosine products from DNA was examined in a mixture of oxidized polymer (50 μg) and endo III (3 μg) in 50 μl of 100 mM sodium phosphate (pH 7.4). Before starting the reaction, the mixture was dialyzed 45 min against 100 mM sodium phosphate at 4°C to remove glycerol. At this point, equal amounts of four stable isotopes (+3 atomic mass units) were added as internal standards, which included of 5-hydroxycytosine, 5-hydroxyuracil, and the cis and trans isomers of uracil glycols. The enzymatic reaction was terminated by the addition of 10 volumes of cold acetone, followed by storage at -20°C and centrifugation at 13,200 g for 30 min to precipitate polymers and protein. The supernatant was removed and dried under vacuum. Modified nucleobases were trimethylsilylated and subjected to GC/MS analysis, as described above.

RESULTS

Analysis of oxidation products by acid and enzymatic hydrolysis

The oxidation of cytosine by KMnO_4 involves the initial formation of cytosine glycols followed by their decomposition to 5-hydroxycytosine and uracil glycols (Figure 1). In the present work, the target of oxidation was cytosine in double stranded poly(dG-dC) and poly(dI-dC). For the analysis of specific cytosine products, the oxidized polymers were first subjected to acid hydrolysis with formic acid, enzymatic hydrolysis with P1 nuclease and alkaline phosphatase, or enzymatic excision with purified endonuclease III, and then, the modified nucleobases and nucleosides were quantitated by GC/MS and/or HPLC/EC (Figure 2). The analysis of oxidized poly(dG-dC) by acid hydrolysis coupled to HPLC/EC showed the formation of two products: 5-hydroxycytosine and 5-hydroxyuracil (Figure 2a). It should be noted that the amount of 5-hydroxycytosine (3) measured in oxidized polymers represented the sum of cytosine glycols (2) and 5-hydroxycytosine (3) (Reaction II, Figure 1). During acid hydrolysis, cytosine glycols in polymers were likely quantitatively converted to 5-hydroxycytosine in agreement with studies of cytosine glycol nucleosides (11). Likewise, the amount of 5-hydroxyuracil (5) represented the sum of uracil glycols (4) and 5-hydroxyuracil (5) (Reaction IV, Figure 1).

The amount of 5-hydroxycytosine was also measured in oxidized polymers by enzymatic hydrolysis with P1 nuclease and alkaline phosphatase, which gave a mixture of deoxyribonucleosides. Similar to thymine glycols, the presence of cytosine and uracil glycols probably inhibited P1 nuclease cleavage next to sites of damage (28,29). However, the hydrolysis of DNA containing cytosine glycols should go to completion because these glycols will efficiently transform in P1 nuclease resistant fragments to 5-hydroxycytosine. Using identical samples of oxidized polymer, we observed that the amount of 5-hydroxycytosine by

acid hydrolysis was equal to the amount of 5-hydroxycytosine nucleoside by enzymatic hydrolysis. In contrast, the analyses were different for 5-hydroxyuracil. The analysis of nucleobase products by acid hydrolysis and HPLC/EC analysis gave a substantial amount of 5-hydroxyuracil in oxidized polymers, approximately $\frac{1}{2}$ of the yield of 5-hydroxycytosine, whereas the analysis of nucleosides by enzymatic hydrolysis and HPLC/EC did not show any detectable 5-hydroxyuracil nucleoside. The absence of 5-hydroxyuracil nucleoside indicated that this product was not formed in poly(dG-dC) and poly(dI-dC) by oxidation with KMnO_4 . In other words, the entirety of 5-hydroxyuracil observed in oxidized polymers by acid hydrolysis and GC/MS analysis may be attributed to the formation of uracil glycols.

Oxidation of poly(dG-dC) and poly(dI-dC) by KMnO_4

The profile of oxidation products was examined by acid hydrolysis and GC/MS analysis of oxidized poly(dG-dC) and poly(dI-dC). The formation of 5-hydroxycytosine and 5-hydroxyuracil in oxidized polymers was confirmed by comparison of their mass spectra with those of authentic standards. The formation of other oxidation products of cytosine, including 5,6-dihydroxyuracil, 5-hydroxyhydantoin, and alloxan, was not detected; the yield of these products was estimated to be less than 10% that of 5-hydroxycytosine. Thus, the major oxidation products of oxidation of poly(dG-dC) and poly(dI-dC) by KMnO_4 were cytosine glycols and uracil glycols. It should also be noted that damage appeared to be uniformly distributed in polymers, with no indication of a bias toward the oxidation of single stranded regions in poly(dG-dC) and poly(dI-dC). It is known that the oxidation of DNA by KMnO_4 takes place 10 to 20-fold more efficiently in single stranded regions than that of double stranded regions (30). In contrast, the oxidation of poly(dG-dC) and poly(dI-dC) proceeded by single hit kinetics at low reaction time (0-4 h). Furthermore, pre-incubation of polymers with S1 nuclease to remove

single stranded or looped sequences did not change the yield of oxidation products, indicating that cytosine oxidation occurred predominantly in double stranded regions of the polymers.

The oxidation of poly(dG-dC) and poly(dI-dC) by KMnO_4 depended on the concentration of salt (Figure 3). For poly(dG-dC), the formation of cytosine glycol was biphasic as a function of NaCl concentration with a gradual increase between 0 and 2 M, followed by a much sharper increase between 2 and 3 M (Figure 3a). In contrast, the formation of uracil glycol in poly(dI-dC) was linear at all concentrations of NaCl (Figure 3b). The ratio of cytosine to uracil glycols remained constant at all concentrations of NaCl for poly(dG-dC) with a ratio of approximately 2:1, whereas for poly(dI-dC), this ratio increased from 4:1 at 0.5 M NaCl to 6:1 at 3.0 M NaCl. The addition of bisulfite ($\text{Na}_2\text{O}_5\text{S}_2$) to quench the reaction of KMnO_4 can not account for changes in the yield of deamination products in oxidized polymers because a large excess of bisulfite did not induce any changes in the distribution of products (data not shown).

Decomposition of cytosine glycols in oxidized polymers

The thermal decomposition of cytosine glycols was examined in oxidized polymers by incubation of the polymers at 37°C (Figure 4). The loss of cytosine glycols was accompanied with a gain of uracil glycols, which is consistent with the deamination of cytosine glycols to uracil glycols in oxidized polymers (Reaction III, Figure 1). The rates of decomposition and growth were the same ($k = 0.10 \text{ h}^{-1}$ or half-life of 6.5 h; Figure 4a). In addition, the decrease in the amount of cytosine glycols was comparable to the increase in the amount of uracil glycols, with values of 540 and 350 damages per 1000 non-modified cytosine, respectively. The lower than expected yield of uracil glycols suggests that uracil glycols, or more likely 5-hydroxyuracil, undergo decomposition during the acid hydrolysis step. Taking the average of the two values $((540 + 350)/2)$ indicated that cytosine glycols in poly(dG-dC) mainly undergo dehydration to

give 5-hydroxycytosine $((3270-445)/3270=86\%)$ and, to a lesser extent, deamination to give uracil glycols (14%). The decomposition of cytosine glycols was also examined in oxidized poly(dI-dC) (results not shown). The lifetime of cytosine glycols was 2-fold shorter in poly(dI-dC) than in poly(dG-dC). The percentage of cytosine glycols undergoing dehydration in poly(dI-dC) was estimated to be 85% as inferred by the change of oxidation products as a function of incubation time. In subsequent studies, we examined the decomposition of cytosine glycols in poly(dG-dC) at different pH and salt concentrations (Figure 4b). Interestingly, the rate of decomposition of cytosine glycols was 2-fold greater in acid (pH 5.5) than in neutral solutions (pH 7 and 8) and it increased 3 to 4-fold in going from 0.15 M to 2.0 M NaCl.

The decomposition of cytosine glycols in poly(dG-dC) and poly(dI-dC) was examined in strong alkali. It was necessary to add EDTA to the reaction in order to protect 5-hydroxycytosine from secondary oxidation; this oxidation only occurs at high pH and appears to arise from a by-product of MnO_4 oxidation of DNA (31). When oxidized polymers were subjected to alkali hydrolysis (phosphate buffer; EDTA; pH 12), the amount of cytosine glycols in the polymers was observed to decrease 20% of initial values. Although this behavior contrasts alkali-induced decomposition of thymine glycols in oxidized plasmid DNA (32), it is very similar to the decomposition of cytosine glycol nucleoside at high pH, which mainly undergoes dehydration to 5-hydroxycytosine (11). In parallel experiments, the decomposition of uracil glycols was examined in oxidized polymers. Alkali hydrolysis of uracil glycols was nearly identical to that reported for thymine glycols, both showing complete decomposition after 2 h.

Excision of cytosine glycols by endo III

The excision of cytosine glycols from oxidized polymer by endo III was studied by comparing

the profile of excision products between freshly oxidized polymers, which contained mostly cytosine glycols, and heat-treated polymers, which contained mostly 5-hydroxycytosine. For this purpose, each oxidized polymer was divided into two aliquots. The first aliquot was kept at -20°C to preserve cytosine glycols within the polymer, whereas the other aliquot was incubated at 37°C to completely transform initial cytosine glycols to 5-hydroxycytosine and uracil glycols. Oxidation products were then determined for each aliquot of oxidized polymer by acid hydrolysis and HPLC/EC analysis. Assuming that freshly oxidized polymers contained cytosine glycols but no 5-hydroxycytosine, the results indicated that the majority (78%) of initial cytosine glycols undergo dehydration to 5-hydroxycytosine, whereas a minor fraction (22%) undergo deamination to 5-hydroxyuracil (Table 1). In additional experiments, the excision of cytosine oxidation products was examined using oxidized poly(dI-dC). These studies showed a significant decrease in the excision of cytosine glycol from fresh polymer compared to the excision of 5-hydroxycytosine from heat-treated polymer. The disappearance of 5-hydroxycytosine during thermal decomposition suggested a division between dehydration and deamination of 87% and 13%, respectively, similar to that observed for poly(dG-dC).

The release of cytosine oxidation products from oxidized poly(dG-dC) and poly(dI-dC) by endo III was estimated by GC/MS analysis using isotopic dilution to correct for losses of product during sample preparation (Figure 2; Table 1). The excision reaction was optimized with respect to the buffer (sodium phosphate; 100 mM; pH 7.4), the ratio of substrate to enzyme (1 to 25), and the reaction time (2 h). Under these conditions, the rate of excision was linear and directly proportional to the initial amount of cytosine oxidation products in oxidized polymer (data not shown). The results showed that there was 4.8-fold more 5-hydroxycytosine present in the supernatant of freshly oxidized poly(dG-dC) than of heat treated polymer following treatment

with endo III (Table 1). Because the only difference between the two substrates was the amount of cytosine glycols and 5-hydroxycytosine, these results indicate that cytosine glycols were excised 4.8-fold more efficiently than 5-hydroxycytosine from oxidized poly(dG-dC). Similar results were also observed for poly(dI-dC) (Table 1). In this case, there was only a 3.2-fold difference between freshly oxidized poly(dI-dC) and heat-treated poly(dI-dC). The lower fold difference between the two polymers may be explained by a greater amount of 5-hydroxycytosine in freshly oxidized poly(dI-dC) polymer. In particular, cytosine glycols have a shorter half-life in poly(dI-dC) (3 h) compared to poly(dG-dC) (6.5 h), and thus, the glycols likely transform to some extent during the reaction with endo III.

In contrast to cytosine glycols, the excision of uracil glycols from poly(dG-dC) by endo III did not change between freshly oxidized and heat-treated polymer (Table 1). The excision of cytosine glycols was comparable to that of uracil glycols (17.8 compared to 23.3; Table 1). In GC/MS analysis, three oxidation products of uracil were observed in the supernatant of endo III-polymer reactions. The major product was *cis* uracil glycol (51%), followed by 5-hydroxyuracil (36%) and *trans* uracil glycol (13%), where the percentages represent the average yield of each product divided by the total yield of deamination products (Table 1). The release of *cis* uracil glycol was consistent with its predominant formation in the polymer. For example, the yield of *cis* glycol products is several fold greater than that of the corresponding *trans* glycol products from the oxidation thymine and thymidine by KMnO_4 ; in fact, the presence of *trans* glycol products likely arises from isomerization of initially formed *cis* glycol products (33,33-35). The same results were observed in the oxidation of uracil by KMnO_4 (unpublished results). On the other hand, the presence of 5-hydroxyuracil in endo III/polymer mixtures may be attributed to dehydration of *cis* uracil glycols during sample preparation. For example, nearly the same

percentage of 5-hydroxyuracil in endo III/polymer reactions was observed upon incubation of either purified cis or trans uracil glycols under similar conditions. In general, the cis isomer of pyrimidine glycols is more stable than the corresponding trans isomer, and thus, cis to trans isomerization is not a favorable process in neutral solution (36).

DISCUSSION

Oxidation of poly(dG-dC) and poly(dI-dC) by KMnO_4

Of the four major DNA bases, thymine is the most susceptible to KMnO_4 oxidation. In fact, the high rate of oxidation of thymine has been proposed as a method to detect mismatches in DNA (37). The oxidation of thymine by KMnO_4 is also utilized to specifically introduce thymine glycol modifications into oligonucleotides and DNA fragments (38). The second most reactive base in DNA toward KMnO_4 oxidation is cytosine. The difference in the rate of oxidation between thymine and cytosine is 30-fold for the nucleobases (39), 22-fold for the nucleosides (40), and about 10-fold for the monophosphate derivatives (41), and this difference appears to be even greater for single stranded oligonucleotides (45-fold) and plasmid DNA (27-fold) (30). In general, purines are much less reactive than pyrimidines toward KMnO_4 oxidation. The rate of reaction of KMnO_4 with guanine nucleoside is at least 5-fold less than that with cytosine nucleoside under neutral conditions (40). The least reactive DNA base, i.e., adenine, resists oxidation by KMnO_4 even under harsh conditions (42). Although the oxidation of inosine by KMnO_4 has not been reported, the reactivity of this base is likely the same as that of adenine in view of the similarities of their structure and oxidation potential. Therefore, it is reasonable to assume that cytosine residues in poly(dG-dC) and poly(dI-dC) are the principle target (> 80%) of oxidation by KMnO_4 .

The mechanism of oxidation by KMnO_4 has been studied in great detail for free nucleobases and nucleosides in aqueous solution (33-35). In general, oxidation appears to involve the formation of a cyclic intermediate between MnO_4 and the 5,6-double bond of pyrimidines, followed by its decomposition into glycol and ketone products (41). On the other hand, there have been few studies to address the oxidation of DNA by KMnO_4 . Several years

ago, the major product of thymine oxidation in DNA was identified as *cis* thymine glycols on the basis of radioactive labeling and co-chromatography (38). A more extensive list of DNA base oxidation products was reported from KMnO_4 oxidation of denatured plasmid DNA using acid hydrolysis and GC/MS analysis (43). In the latter study, despite that fact that the majority of damage was observed at thymine, there was a significant increase of damage at cytosine with increasing concentration of oxidant. Of the total products derived from cytosine, the major product was 5-hydroxycytosine (75%), followed in yield by 5,6-dihydroxyuracil (15%) and 5-hydroxyhydantoin (10%) (43). The major acid-stable product in the oxidation of poly(dG-dC) and poly(dI-dC) by KMnO_4 was also 5-hydroxycytosine (this work). In contrast to the previous study, however, we also detected uracil glycols but did not observe either 5,6-dihydroxyuracil or 5-hydroxyhydantoin after acid hydrolysis of polymers. The discrepancies between the two studies may be attributed to differences in experimental conditions; in particular, the oxidation of plasmid DNA was carried out with single stranded DNA.

The oxidation of poly(dG-dC) and poly(dI-dC) by KMnO_4 increased with increasing ionic strength. For the oxidation of poly(dG-dC), there was a rapid increase of oxidation at high salt concentrations. This may be attributed to a shift in DNA structure from B to Z forms such that DNA bases in the Z form are more susceptible to oxidation (44). In contrast to poly(dG-dC), the oxidation of cytosine in poly(dI-dC) did not dramatically change at high salt concentration. This difference may be explained by the fact that poly(dI-dC), in comparison to poly(dG-dC), requires a higher concentration of salt to induce a change in structure from B to Z forms (45). Another difference between poly(dG-dC) and poly(dI-dC) was the effect of salt at low concentrations. In the case of poly(dI-dC), there was a gradual increase in oxidation of 6-fold over the range of salt concentrations (0-3 M). A very similar effect was also reported for the

oxidation of thymine in fully complementary oligonucleotides, showing a 5-10-fold increase in oxidation in going from 0.1 to 4.0 M NaCl (30). The effect of salt on the oxidation of thymine was attributed to electrostatic repulsion between the negative charges of DNA and the attacking permanganate anions (30). In the case of poly(dG-dC), however, there was little change in the oxidation of cytosine at low salt concentration (Figure 3). This difference suggests that poly(dG-dC) was more resistant than poly(dI-dC) to changes in structure at low salt, possibly because of the additional hydrogen bonding and greater duplex stability in the former.

Characterization of cytosine glycols in DNA

The evolution of cytosine oxidation products with time, together with the excision of these products by endo III, strongly support the presence of cytosine glycols in poly(dG-dC) and poly(dI-dC). In oxidized poly(dG-dC), cytosine glycols (measured as 5-hydroxycytosine) decreased with a half-life of 6.5 h whereas uracil glycols (measured as 5-hydroxyuracil) increased with similar kinetics (Figure 4). Although direct analysis of cytosine glycols was not possible, the associated loss and gain of stable products can only be explained by the deamination of initial cytosine glycols. After several half-lives, the measured yield of 5-hydroxycytosine reached a plateau in oxidized polymers, indicating that 5-hydroxycytosine does not directly undergo deamination to 5-hydroxyuracil. In addition, the effects of salt concentration and pH on the decomposition of cytosine glycols in oxidized polymers were very similar to those observed for cytosine glycol nucleoside in aqueous solution (11). The presence of cytosine glycols in oxidized polymers was also supported by the difference in the excision of cytosine oxidation products by endo III between freshly oxidized and heat-treated polymer (Table 1). In freshly oxidized polymers, the main products in polymers were cytosine glycols, whereas in heat-treated samples, the glycols completely transformed to 5-hydroxycytosine. Thus, the

difference in excision between the two samples can only be explained by the transformation from a good substrate, i.e., cytosine glycols, to a relatively poor substrate, i.e., 5-hydroxycytosine, with respect to endo III mediated excision from oxidized polymer.

Our analysis indicated that uracil glycol but no 5-hydroxyuracil was produced in oxidized poly(dG-dC) and poly(dI-dC). Furthermore, 5-hydroxyuracil was not detected in oxidized polymers even after extensive incubation at 37°C, and thus, uracil glycols do not undergo dehydration to 5-hydroxyuracil within polymers. In comparison, uracil photohydrates (6-hydroxy-5,6-dihydrocytosine and 6-hydroxy-5,6-dihydrouracil) appear to undergo dehydration to uracil within photoirradiated polymers, e.g., poly(dA-dU) and poly(dG-dC), although the activation energy for the dehydration of uracil photohydrate is much higher than that for cytosine photohydrates (46,47). The lack of dehydration of uracil glycols to 5-hydroxyuracil in polymers suggests that there are alternative pathways of formation of 5-hydroxyuracil in DNA; for example, a possibility is that intermediate hydroperoxides, which are produced upon exposure of DNA to ionizing radiation, transform to 5-hydroxyuracil by the elimination of H₂O₂ (10,27,48).

Excision of cytosine oxidation products

The excision of oxidative damage by purified DNA repair enzymes depends on the secondary structure and the nucleotide sequence of DNA, as well as the experimental conditions. Wallace and co-workers (14,49) reported that the relative efficiency (V_{\max}/K_m) for the excision of uracil glycols was 2.3-fold greater than that for thymine glycols, whereas the excision of thymine glycols was 7-fold greater than 5-hydroxycytosine. The same difference between thymine glycols and 5-hydroxycytosine was reported by Cadet and co-workers (50). In close agreement with the above studies, the difference in excision between uracil glycols and 5-hydroxycytosine was 6.4-fold (24.5/3.8) for poly(dG-dC) and 8.3-fold (36.4/4.4) for poly(dI-dC) (Table 1).

Despite the large number of studies on endo III substrate specificity, they have failed to distinguish between the excision of cytosine glycols and 5-hydroxycytosine. The relative rates of excision (V_{\max}/K_m) of several products have been compiled for endo III and oxidized calf thymus DNA using acid hydrolysis and GC/MS. However, these analyses do not distinguish between the excision of cytosine glycols and 5-hydroxycytosine (27,51). In the present study, the excision of the two products was determined by comparison of the rates of excision from fresh and heat-treated polymers. The final analysis indicated that cytosine glycols in oxidized polymers are comparable substrates to uracil glycols for excision by endo III, whereas both of these substrates are much better substrates (3-5-fold) than 5-hydroxycytosine (Table 1). The relatively high efficiency of excision for cytosine glycols implies that endo III or similar enzymes may repair cytosine glycols in cellular DNA before they decompose to stable products, i.e., uracil glycols and 5-hydroxycytosine. The repair of cytosine glycols should be considered as the first line of defense against mutagenesis induced by oxidative damage to cytosine.

ACKNOWLEDGEMENTS.

This work was supported by a strategic grant in Nutrition and Cancer from the Cancer Research Society, Inc., Canada. S.T. was the recipient of a bursary for his graduate studies from the Cancer Research Society, Inc. and J. R. W. held a scholarship from “Fonds de Recherche en Sante du Quebec”.

Figure Legend

Figure 1. Formation and decomposition of cytosine glycols. Cytosine (1) was oxidized to cytosine glycols (2) by KMnO_4 (Reaction I; Figure 1). Cytosine glycols (2) decomposed by either dehydration to 5-hydroxycytosine (3; reaction II) or deamination to uracil glycols (4; reaction III). During acid hydrolysis of DNA, cytosine glycols (2) and uracil glycols (4) were quantitatively converted to 5-hydroxycytosine (3) and 5-hydroxyuracil (5), respectively (Reactions II and IV; Figure 1). Thus, the amount of 5-hydroxycytosine obtained by acid hydrolysis corresponded to the sum of cytosine glycols (2) and 5-hydroxycytosine (3), whereas the amount of 5-hydroxyuracil (5) corresponded to the sum of uracil glycols (4) and 5-hydroxyuracil (5).

Figure 2. Analyses of cytosine oxidation products. a) HPLC/EC analysis of 5-hydroxycytosine (3) and 5-hydroxyuracil (5). Top chromatogram—standard compounds; middle chromatogram—freshly oxidized poly(dG-dC) subjected to acid hydrolysis; bottom chromatogram—heat treated oxidized poly(dG-dC) subjected to acid hydrolysis. Products 3 and 5 were detected by electrochemical detection with individual cells set at 75 mV and 350 mV, respectively. b) GC/MS analysis of 5-hydroxycytosine (3), 5-hydroxyuracil (5), and uracil glycols (4a and 4b). The samples were prepared from polymers by either acid hydrolysis or incubation with endo III followed by trimethylsilylation of the resulting nucleobases. The most abundant ion in the mass spectrum was chosen for selective ion monitoring (molecular ion – 15 amu, unless indicated): 5-hydroxycytosine (3, 328 m/z); 5-hydroxyuracil (5, 329 m/z); trans uracil glycol (4a, 245 m/z, ion fragment) and cis uracil glycol (4b, 245 m/z, ion fragment). The peak at 27 min was an impurity. c) Quantitation of 5-hydroxycytosine (3), released from oxidized poly(dG-dC) by endo III, was achieved by GC/MS analysis with selective ion monitoring. The amount of 5-hydroxycytosine

was quantitated from the ratio of natural product released by endo III to the corresponding isotopically-labeled isotope (+3 m/z), which was added before the addition of enzyme. The chromatogram depicts the excision of the 5-hydroxycytosine (3) from freshly oxidized poly(dG-dC) (left) and heat-treated polymer (right).

Figure 3. Effect of ionic strength on the oxidation of poly(dG-dC) and poly(dI-dC). a) oxidation of poly(dG-dC) (0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) by KMnO_4 (2 mM, 60 min) as a function NaCl (0.0-3.0 M) in phosphate buffer (25 mM, pH 7.0). b) oxidation of poly(dI-dC) (0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) by KMnO_4 (1 mM, 120 min) in phosphate buffer (25 mM, pH 7.0). Quantitation of cytosine glycols (solid circles) and uracil glycols (solid squares) was carried out by acid hydrolysis followed by HPLC/EC analysis (Figures 1 and 2). Error bars ($\pm\text{SD}$) represent the average of three experiments.

Figure 4. Thermal decomposition of cytosine glycols in oxidized poly(dG-dC). Decomposition was carried out in phosphate buffer (25 mM, pH 7.0) containing 0.15 NaCl and 1 mM EDTA. Quantitation of cytosine glycols (solid circles) and uracil glycols (solid squares) was carried out by acid hydrolysis and HPLC/EC. The dashed line represents the best fit of data to an exponential function ($y = y_0 + b \cdot e^{-t/k}$), where y_0 and y are the yield of product at time zero and at specific times of incubation (t), respectively, k is the rate of decomposition or growth, and b is a constant. From these analyses, the rate of decomposition of cytosine glycols was -0.11 h^{-1} whereas the growth of uracil glycols was 0.10 h^{-1} ($n=7$; $r^2 \geq 0.94$). Repeated experiments gave similar rates of decomposition and growth. b) Top panel: decomposition of cytosine glycols as a function of pH (5-8) in phosphate buffer (25 mM) at a fixed concentration of NaCl (0.15 M); bottom panel: decomposition of cytosine glycols as a function of salt concentration (0.15-2 M) in

phosphate buffer at pH 7.0 (25 mM, pH 7.0). Rates were estimated from the best fit of data to the above exponential function ($n=7$; $r^2 \geq 0.97$).

Table 1. Excision of cytosine and uracil oxidation products for oxidized poly(dG-dC) and poly(dI-dC) by endo III.

	Damage cytosine products ^a (2 or 3)	Percent excision ^b (2 or 3)	Damage uracil products ^a (4a)	Percent excision ^b (4a,4b,5)	<i>trans</i> uracil glycol (4a)	<i>cis</i> uracil glycol (4b)	5- hydroxyl- uracil (5)
Poly(dG-dC) fresh	180 ± 13	17.8 ± 1.1	58.9 ± 10.4	23.3 ± 1.7	4.1 ± 0.3	11.5 ± 1.0	7.6 ± 0.3
Poly(dG-dC) heated ^c	141 ± 13	3.8 ± 0.3	84.0 ± 4.8	24.5 ± 1.1	1.6 ± 0.6	13.3 ± 0.2	9.6 ± 0.2
Ratio		4.75		0.95			
Poly(dI-dC) fresh	433 ± 9	14.0 ± 0.8	127.5 ± 3.7	27.1 ± 1.2	4.2 ± 0.1	13.5 ± 0.7	9.3 ± 0.4
Poly(dI-dC) heated ^c	378 ± 21	4.4 ± 0.4	128.3 ± 5.9	36.4 ± 1.2	4.1 ± 0.2	18.2 ± 0.3	14.0 ± 0.7
Ratio		3.18		0.74			

^aInitial damage in pmol for 50 µg of polymer was estimated by acid hydrolysis and HPLC/EC analysis (Figure 2). ^bPercent excision of initial damage. ^cpolymer was pre-incubated at 37°C to transform cytosine glycols (**2**) to 5-hydroxycytosine (**3**).

Figure 1 (Tremblay and Wagner)

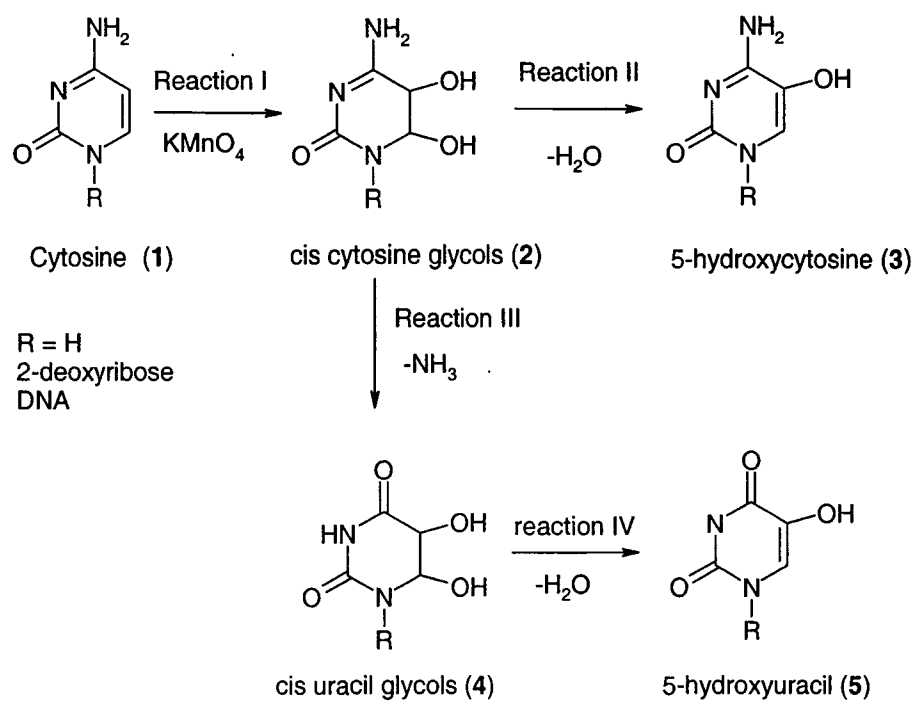


Figure 2 (Tremblay and Wagner)

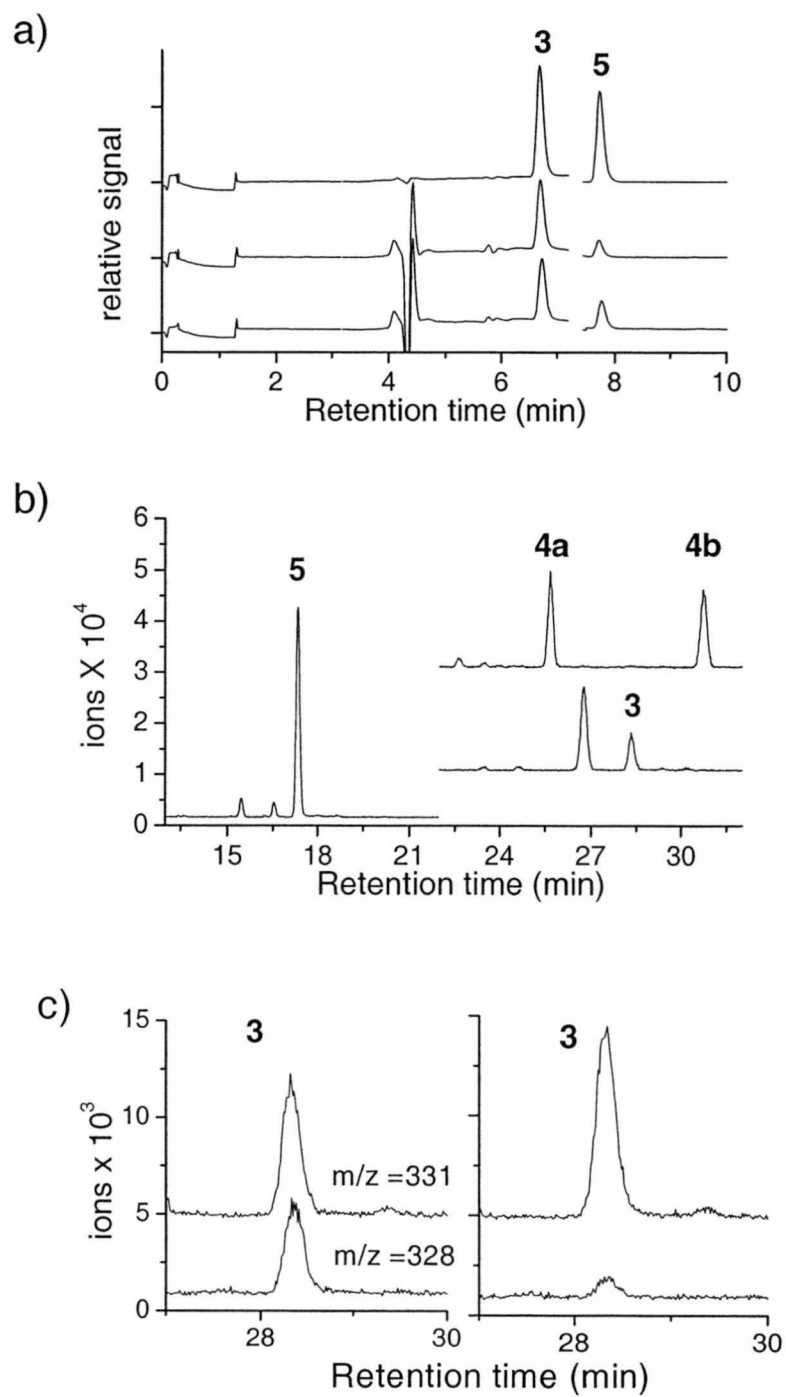


Figure 3 (Tremblay and Wagner)

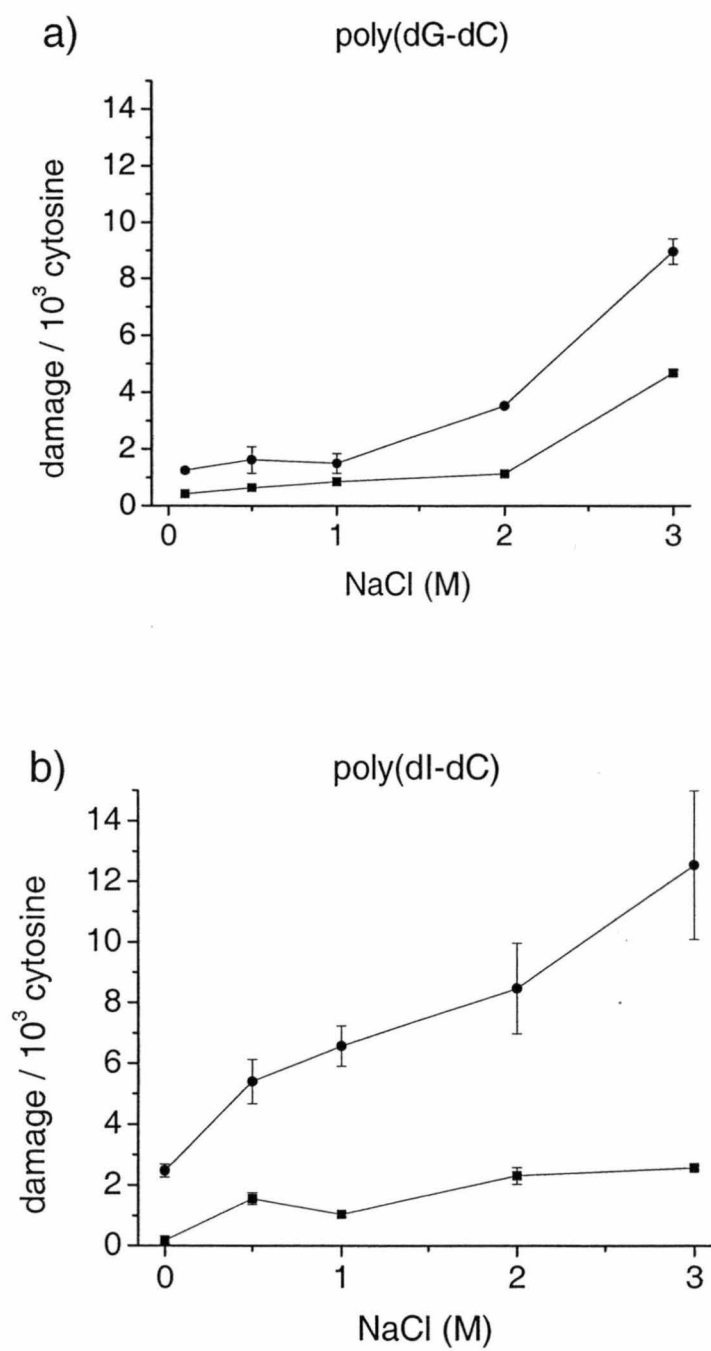
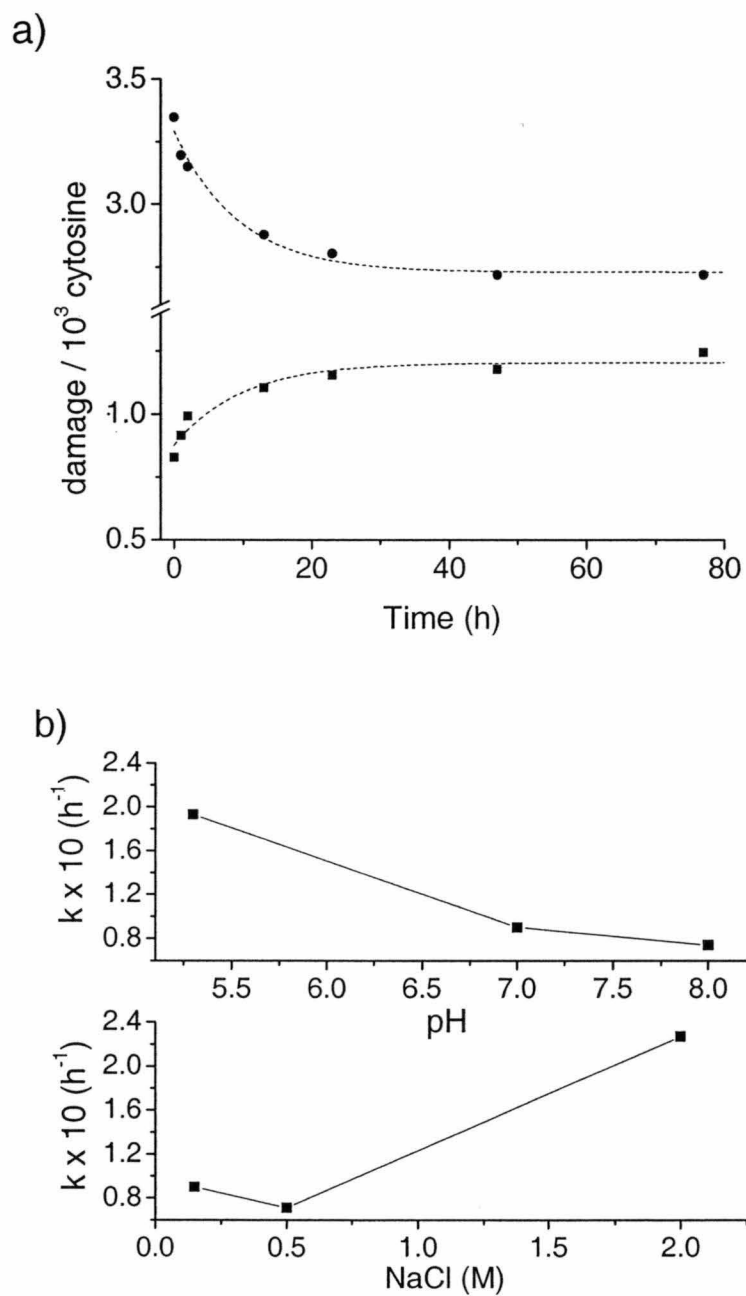


Figure 4 (Tremblay and Wagner)



Reference List

1. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1999) Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, Oxford, UK.
2. Clayson B. D. , Mehta R. and Iverson F. (1994) Oxidative DNA damage-The effect of certain genotoxic and operationally non-genotoxic carcinogens. *Mutat. Res.*, **317**, 25-42.
3. Henle, E.S. and Linn, S. (1997) Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, **272**, 19095-19098.
4. Cadet, J., Berger, M., Douki, T. and Ravanat, J.L. (1997) Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, **131**, 1-87.
5. Cadet, J., Bourdat, A.G., D'Ham, C., Duarte, V., Gasparutto, D., Romieu, A. and Ravanat, J.L. (2000) Oxidative base damage to DNA: specificity of base excision repair enzymes. *Mutat. Res.*, **462**, 121-128.
6. Lenton, K.J.; Therriault, H., Fulop, T., Payette, H. and Wagner, J.R. (1999) Glutathione and ascorbate are negatively correlated with oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Carcinogenesis*, **20**, 607-613.
7. Hamilton, M.L., Van Remmen, H., Drake, J.A., Yang, H., Guo, Z.M., Kewitt, K., Walter, C.A. and Richardson, A. (2001) Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 10469-10474.
8. Beckman, K.B. and Ames, B.N. (1998) The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, **78**, 547-581.
9. Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M. (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 7915-7922.
10. Wagner J.R., Decarroz C, Berger M and Cadet J (1999) Hydroxyl radical-induced decomposition of 2'-deoxycytidine in aerated aqueous solutions. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 4101-4110.
11. Tremblay S, Douki T, Cadet J and Wagner J.R. (1999) 2'-Deoxycytidine glycols, a missing link in the free radical-mediated oxidation of DNA. *J. Biol. Chem.*, **274**, 20833-20838.
12. Kreutzer, D.A. and Essigmann, J.M. (1998) Oxidized, deaminated cytosines are a source of C --> T transitions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 3578-3582.
13. Purmal, A.A. , Kow, Y.W. and Wallace, S.S. (1994) Major oxidative products of cytosine, 5-hydroxycytosine and 5-hydroxyuracil, exhibit sequence context-dependent mispairing in vitro. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 72-78.
14. Purmal, A.A. , Lampman, G.W., Bond, J.P., Hatahet, Z. and Wallace, S.S. (1998)

- Enzymatic processing of uracil glycol, a major oxidative product of DNA cytosine. *J. Biol. Chem.*, **273**, 10026-10035.
15. Shen, J.C., Rideout, W.M. and Jones, P.A. (1994) The rate of hydrolytic deamination of 5-methylcytosine in double-stranded DNA. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 972-976.
 16. Wang, D., Kreutzer, D.A. and Essigmann, J.M. (1998) Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutat. Res.*, **400**, 99-115.
 17. Reid, T.M. and Loeb, L.A. (1993) Tandem double CC→TT mutations are produced by reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 3904-3907.
 18. Millar, C.B., Guy, J., Sansom, O.J., Selfridge, J., MacDougall, E., Hendrich, B., Keightley, P.D., Bishop, S.M., Clarke, A.R. and Bird, A. (2002) Enhanced CpG mutability and tumorigenesis in MBD4-deficient mice. *Science*, **297**, 403-405.
 19. Gan, J., Zhang, Y.L., Carter, K.B., Cauthron, R.D. and Steinberg, R.A. (1999) On the spontaneous mutability of CpG sites in cultured S49 mouse lymphoma cells. *Cell. Mol. Genet.*, **25**, 129-145.
 20. Hayes, R.C., Petrullo, L.A., Huang, H.M., Wallace, S.S. and LeClerc, J.E. (1988) Oxidative damage in DNA. Lack of mutagenicity by thymine glycol lesions. *J. Mol. Biol.*, **201**, 239-246.
 21. Najrana, T., Saito, Y., Uraki, F., Kubo, K. and Yamamoto, K. (2000) Spontaneous and osmium tetroxide-induced mutagenesis in an Escherichia coli strain deficient in both endonuclease III and endonuclease VIII. *Mutagenesis*, **15**, 121-125.
 22. Cooper, D.N. and Youssoufian, H. (1988) The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Hum. Genet.*, **78**, 151-155.
 23. O'Neill, J.P. and Finette, B.A. (1998) Transition mutations at CpG dinucleotides are the most frequent in vivo spontaneous single-base substitution mutation in the human HPRT gene. *Environmental & Molecular Mutagenesis*, **32**, 188-191.
 24. Bienvenu, C. and Cadet, J. (1996) Synthesis and kinetic study of the deamination of the cis diastereomers of 5,5-dihydroxy-5,6-dihydro-5-methyl-2'-deoxycytidine. *J. Org. Chem.*, **61**, 2632-2637.
 25. Moschel, R.C. and Behrman, E.J. (1974) Oxidation of nucleic acid bases by potassium peroxodisulfate in alkaline aqueous solution. *J. Org. Chem.*, **39**, 1983-1989.
 26. Wagner, J.R. (1994) Analysis of oxidative cytosine products in DNA exposed to ionizing radiation. *J. Chim. Phys.*, **91**, 1280-1286.
 27. Wagner, J.R., Blount, B.C. and Weinfeld, M. (1996) Excision of oxidative cytosine modifications from gamma-irradiated DNA by Escherichia coli endonuclease III and human whole-cell extracts. *Anal. Biochem.*, **233**, 76-86.

28. Box, H.C., Budzinski, E.E., Evans, M.S., French, J.B. and Maccubbin, A.E. (1993) The differential lysis of phosphoester bonds by nuclease P1. *Biochim. Biophys. Acta*, **1161**, 291-294.
29. Weinfeld, M. , Soderlind, K.J. and Buchko, G.W. (1993) Influence of nucleic acid base aromaticity on substrate reactivity with enzymes acting on single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 621-626.
30. Hansler, U. and Rokita, S.E. (1993) Electrostatics rather than conformation control the oxidation of DNA by the anionic reagent permanganate. *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 8554-8557.
31. Wolfe, J.L., Kawate, T., Sarracino, D.A., Zillmann, M., Olson, J., Stanton, V.P. and Verdine, G.L. (2002) A genotyping strategy based on incorporation and cleavage of chemically modified nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 11073-11078.
32. Ide, H., Kow, Y.W. and Wallace, S.S. (1985) Thymine glycols and urea residues in M13 DNA constitute replicative blocks in vitro. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 8035-8052.
33. Iida, S. and Hayatsu, H. (1970) The permanganate oxidation of thymine. *Biochim. Biophys. Acta*, **213**, 1-13.
34. Iida, S. and Hayatsu, H. (1971) The permanganate oxidation of thymidine and thymidylic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, **228**, 1-8.
35. Cadet, J. and Teoule, R. (1977) Oxydation permanganique de la thymidine en solution aqueuses neutre et alkaline. *J. Chem. Res. (M)*, 3228-3236.
36. Cadet J., Teoule R. and Ulrich J. (1975) Isomerisation and new specific synthesis of thymine glycol. *Tetrahedron*, **31**, 2057-2061.
37. Lambrinakos, A., Humphrey, K.E., Babon, J.J., Ellis, T.P. and Cotton, R.G. (1999) Reactivity of potassium permanganate and tetraethylammonium chloride with mismatched bases and a simple mutation detection protocol. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 1866-1874.
38. Frenkel, K., Goldstein, M.S., Duker, N.J. and Teebor, G.W. (1981) Identification of the cis-thymine glycol moiety in oxidized deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, **20**, 750-754.
39. Bui, C.T. and Cotton, R.G. (2002) Comparative study of permanganate oxidation reactions of nucleotide bases by spectroscopy. *Bioorg. Chem.*, **30**, 133-137.
40. Nawamura, T. , Negishi, K. and Hayatsu, H. (1994) 8-Hydroxyguanine is not produced by permanganate oxidation of DNA. *Arch. Biochem. Biophys.*, **311**, 523-524.
41. Hayatsu, H. (1996) The 5,6-double bond of pyrimidine nucleosides, a fragile site in nucleic acids. *J. Biochem.*, **119**, 391-395.
42. Jones, A.S., Ross, W.G., Takemura, S., Thompson, W.T. and Walker, T.R. (1964) The

nucleotide sequence in deoxyribonucleic acids part VI: The preparation and reactions of permanganate-oxidised deoxyribonucleic acid.373-378.

43. Akman, S.A., Doroshow, J.H. and Dizdaroglu, M. (1990) Base modifications in plasmid DNA caused by potassium permanganate. *Arch. Biochem. Biophys.*, **282**, 202-205.
44. Loprete, D.M. and Hartman, K.A. (1993) Conditions for the stability of the B, C, and Z structural forms of poly(dG-dC) in the presence of lithium, potassium, magnesium, calcium, and zinc cations. *Biochemistry*, **32**, 4077-4082.
45. Miskovsky, P., Tomkova, A., Chinsky, L. and Turpin, P.Y. (1993) Conformational transitions of poly(dI-dC) in aqueous solution as studied by ultraviolet resonance Raman spectroscopy. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **11**, 655-669.
46. Boorstein, R.J., Hilbert, T.P., Cunningham, R.P. and Teebor, G.W. (1990) Formation and stability of repairable pyrimidine photohydrates in DNA. *Biochemistry*, **29**, 10455-10460.
47. Boorstein, R.J., Hilbert, T.P., Cadet, J., Cunningham, R.P. and Teebor, G.W. (1989) UV-induced pyrimidine hydrates in DNA are repaired by bacterial and mammalian DNA glycosylase activities. *Biochemistry*, **28**, 6164-6170.
48. Wagner, J.R., Hu, C.C. and Ames, B.N. (1992) Endogenous oxidative damage of deoxycytidine in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 3380-3384.
49. Hatahet, Z., Kow, Y.W., Purmal, A.A., Cunningham, R.P. and Wallace, S.S. (1994) New substrates for old enzymes. 5-Hydroxy-2'-deoxycytidine and 5-hydroxy-2'-deoxyuridine are substrates for Escherichia coli endonuclease III and formamidopyrimidine DNA N-glycosylase, while 5-hydroxy-2'-deoxyuridine is a substrate for uracil DNA N-glycosylase. *J. Biol. Chem.*, **269**, 18814-18820.
50. D'Ham, C., Romieu, A., Jaquinod, M., Gasparutto, D. and Cadet, J. (1999) Excision of 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymine, 5,6-dihydrothymine, and 5-hydroxycytosine from defined sequence oligonucleotides by Escherichia coli endonuclease III and Fpg proteins: Kinetic and mechanistic aspects. *Biochemistry*, **38**, 3335-5344.
51. Dizdaroglu M, Bauche C, Rodriguez H and Laval J (2000) Novel substrates of Escherichia coli Nth protein and its kinetics for excision of modified bases from DNA damaged by free radicals. *Biochemistry*, **39**, 5586-5592.

Chapitre IV – Troisième article

Oxidation of 2'-deoxycytidine to imidazolidine products: interconversion of four diastereomers

Sébastien Tremblay, Tsvetane Ganchev, Luc Tremblay, Pierre Lavigne, Jean Cadet, J. Richard Wagner

Journal of American Chemical society: en préparation

Oxidation of 2'-deoxycytidine to four interconverting diastereomers of 1-carbomoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine nucleosides

¹Sébastien Tremblay, ¹Tsvetan Ganchev, ²Luc Tremblay, ²Pierre Lavigne, ³Jean Cadet
and ¹J. Richard Wagner*

¹Groupe en Science des Radiations, Faculté of Médecine, Université de Sherbrooke, (Québec) Canada J1H 5N4 ²Institut de Pharmacologie, 3001 12^e avenue Nord, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, (Québec) Canada J1H 5N4. ³Département de Recherche Fondamentale sur la Matière Condensée, SCIB/LAN, CEA/Grenoble, France

Key Words

Running title

Abstract

Free radical induced oxidation of 2'-deoxycytidine (dCyd) leads to the formation of various pyrimidine ring saturated, fragmented and rearrangement products by way of intermediate 5(6)-hydroxy-6(5)-hydroperoxides. To prepare the 5-hydroxy-6-hydroperoxides of dCyd, the bromohydrins of dCyd were mixed with H₂O₂ in the presence of Ag₂O. From the reaction mixture, four diastereomers of N1-(2-deoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-1-carbamoyl-2-oxo-4,5-dihydroxyimidazolidine were separated by HPLC and their structure and stereochemistry was determined by ¹H-NMR, ¹³C-NMR and NOESY. In particular, NOESY experiments revealed H-bonding between the hydroxyl groups of the imidazolidine ring and the exocyclic hydroxymethyl group depending on the stereochemistry of C4 and C5 substituents. Conversion of dCyd bromohydrins into imidazolidine products was highly stereospecific with retention of the configuration at C6, suggesting that intermediate species decompose by a concerted pathway. A remarkable feature of the four diastereomers was their ability to interconvert via two different pathways of ring-chain tautomerism: one occurring at N1-C5 leading to inversion of C5, and the other occurring at N3-C4 leading to inversion of C4. In acidic solution, the *cis* diastereomers rapidly transform into the *trans* diastereomers by ring chain tautomerism at N1-C5 whereas the reverse reaction (*trans* to *cis*) is about 100-fold less efficient. In neutral and alkali solution (pH 7-9), the rate of tautomerism at N1-C5 sharply increases and is accompanied with an additional tautomerism at N3-C4 as shown by interconversion between *trans* diastereomer (*trans* to *cis* to *trans*). In summary, this work reports the structural features of novel diastereomers of imidazolidine nucleosides, major products of dCyd oxidation, and sheds light on the chemistry of their interconversion in aqueous solution.

Introduction

Reactive oxygen species (ROS) are generated by various biological processes, including oxidative phosphorylation, inflammation, and as well, they are by-products in the synthesis and oxidation of numerous biomolecules. The constant generation of ROS in organisms is believed to contribute to aging and the development of age-related diseases, such as cancer.¹⁻⁷ The reactions of ROS with DNA have been studied to a large extent using photosensitization and ionizing radiation as a means to generate specific radical species. The most damaging species from the radiolysis of water are hydroxyl radicals, which react at nearly diffusion controlled rates with DNA bases.⁸ The addition of hydroxyl radicals to unsaturated sites of pyrimidines and purines derivatives gives hydroxyl radical adducts, whereas the abstraction of hydrogen atoms from DNA base and sugar components leads to several other carbon-centered species.⁸⁻¹⁰ In presence of oxygen, these initial species transform in large part into peroxy radicals and hydroperoxides, particularly in DNA, where bimolecular reactions are largely suppressed. The decomposition of DNA radicals and hydroperoxides can lead to a broad spectrum of final damage including modified bases, abasic sites, strand breaks, as well as more complex damage, including tandem lesions, interstrand crosslinks, and protein to DNA cross-links.^{6,10,11} In general, the objective of model studies with nucleosides and oligonucleotides is to elucidate the complex mechanism of damage in genomic DNA and to determine the consequences of this damage in DNA repair and mutagenesis.

The modification of cytosine by reactive oxygen species is very important because this damage has a high probability to induce mutations as inferred by the bias toward GC→AT transition in mutation spectra induced by Fenton reactions and ionizing radiation, as well as by endogenous processes.^{12,13} From pulsed radiolysis studies, it is well known that OH radicals add

to the 5,6-double bond of cytosine to generate mainly C5-OH-cytidin-6-yl radicals (90%), and to some extent (10%), C6-OH-cytidin-5-yl radicals.^{9,14} The major products from the reaction of hydroxyl radicals with cytosine in oxygenated aqueous solution at neutral pH included *trans* 1-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine (25% of total) and 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrouracil (uracil glycols; 23% of total); in addition, 10 other minor stable products were identified.^{15,16} Similarly, the nucleoside derivatives of *trans* 1-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine and uracil glycols are the major stable products of 2-deoxycytidine exposed to ionizing radiation in oxygenated aqueous solutions.^{14,17} Interestingly, *trans* 1-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine was also the major product of irradiation of dGpdC under oxygenated conditions.^{18,19} The formation of the imidazolidine products has been suggested to take place by rearrangement of intermediate 5-hydroxy-6-hydroxperoxides or 6-hydroxy-5-hydroxperoxides (or peroxy radicals) into endoperoxides followed by their decomposition.

In the present work, the 5-hydroxy-6-hydroxperoxides of 2'-deoxycytidine were specifically prepared by the addition of H₂O₂ to the bromohydrins of 2-deoxycytidine in presence of Ag₂O. This approach allows one to control the stereochemistry of the final products because the individual diastereomers of bromohydrins are separated by HPLC before the reaction. From our analyses, we have characterized the *cis* and *trans* diastereomers of 1-carbamoyl-5,6-dihydroxy-2-oxoimidazolidine nucleoside (4 diastereomers) by HPLC and NMR techniques and studied their interconversion in aqueous solution.

Experimental section

Chemicals were purchased from Sigma-Aldrich with the highest purity available. The HPLC system used for products purification consisted of a dual piston pump (model 6000A, Waters, Milford, MA) equipped with a manual injector (model 7125, Rheodyne, Berkeley, CA), and a refractive index detector (model RI-3, Varian, Palo Alto, CA). Kinetic experiments were carried out using a dual pump HPLC (model 616, Waters), a solvent controller (model 600S, Waters), an automated injector (model 717+, Waters), and a PDA detector (model 996, Waters). Data was collected using an AD converter (model SAT/IN, Waters) connected to data acquisition software (Millenium 3.2, Waters). ^1H NMR and ^{13}C NMR analyses were routinely performed on a BRUKER spectropin 300 MHz in Fourier transform mode. Some experiments (NOESY) were also done on a Varian UnityInova 600 MHz (model UnityInova, Varian). All NMR was performed in DMSO- d_6 or D_2O with 3-(trimethylsilyl)propionate-2,2,3,3- d_4 as reference.

Synthesis of dCyd hydroperoxides. First, the bromohydrins of dCyd were synthesized by the slow addition of Br_2 to a solution of dCyd (500 mg in 500 μl of water) at 4°C until the solution developed a pale yellow color. Excess of bromine was removed by bubbling with air. The resulting bromohydrins were separated by HPLC on an octadecilsilyl silica gel $5\mu\text{m}$ particle size column (0.42×25 cm, Polarity, Waters) using water at flow rate of 1.4 ml/min as the mobile phase. The bromohydrins were separated in 1-2 ml and immediately mixed with 5 ml of 30% H_2O_2 at 4°C . The reaction was subsequently induced at 4°C by the addition of Ag_2O . After 1 h at 4°C , the reaction mixture was diluted with 10 volume of water and the entire mixture was frozen and lyophilized dry under vacuum. The resulting dark powder was resolved in 10 ml of cold methanol at -20°C and filtered using $0.22\mu\text{m}$ nylon. Methanol was removed by evaporation on a

rotary evaporator at room temperature. The residue was dissolved in 2 ml of water and analyzed by HPLC using an octadecylsilyl silica gel 5 μ m particle size column (0.42 x 25 cm, Polarity, Waters) with 50 mM NaH₂PO₄ buffer at pH 5.5 at 1.4 ml/min as the mobile phase. For the preparation of large quantities for NMR analyses, the mixture of bromohydrins was treated with H₂O₂ and Ag₂O, and the resulting mixture of diastereomers was separated by HPLC using the same column as above with water at 1.4 ml/min as the mobile phase.

***Trans*-(5S,6S)-5-bromo-6-hydroxy-5,6-dihydro-2'-deoxycytidine (2).** HPLC (Polarity, octadecylsilyl silica gel, H₂O), $k' = (\text{retention volume} - \text{void volume}) / \text{void volume}$, $k' = 1.3$, ¹H NMR analysis (300 MHz, 99,99% D₂O, reference to 3-(trimethylsilyl)-propionate-2,2,3,3-d₄) δ 6,13 (dd, 1H, H_{1'}, $J_{1',2'} = 8,8$ Hz, $J_{1',2''} = 6,0$ Hz), δ 5,31 (d, 1H, H₆, $J_{5,6} = 2,3$ Hz), δ 4,45 (d, 1H, H₅), δ 4,27 (m, 1H, H_{3'}, $J_{2',3'} = 6,1$ Hz, $J_{2'',3'} = 2,7$ Hz), δ 3,80 (m, 1H, H_{4'}, $J_{3',4'} = 3,0$ Hz, $J_{4',5'} = 4,4$ Hz, $J_{4',5''} = 4,5$ Hz), δ 3,58 (d, 2H, H_{5'}-H_{5''}), δ 2,21 (m, 1H, H_{2'}, $J_{2',2''} = -14,0$ Hz), δ 2,04 (m, 1H, H_{2''}).

***Trans*-(5R,6R)-5-bromo-6-hydroxy-5,6-dihydro-2'-deoxycytidine (3).** On the basis of ¹H NMR and electrospray ionization-MS. ¹H NMR analysis (500 MHz, 99,99% D₂O, reference to 3-(trimethylsilyl)-propionate-2,2,3,3-d₄), (Polarity, octadecylsilyl silica gel, H₂O), $k' = 4.2$, δ 6,12 (pst, 1, H_{1'}, $J_{1',2'} = 7,3$, $J_{1',2''} = 6,3$ Hz), δ 5,47 (d, 1, H₆, $J_{5,6} = 2,4$ Hz), δ 4,67 (d, 1, H₅), δ 4,29 (m, 1, H_{3'}, $J_{2',3'} = 6,8$ Hz, $J_{2'',3'} = 3,9$ Hz), δ 3,84 (m, 1, H_{4'}, $J_{3',4'} = 3,9$ Hz), δ 3,69 (dd, 1, H_{5'}, $J_{5',5''} = -12,6$ Hz), δ 3,62 (dd, 1, H_{5''}), δ 2,24 (m, 1, H_{2'}, $J_{2',2''} = -13,7$ Hz), δ 2,15 (m, 1, H_{2''}). Electrospray ionization-MS (positive mode) m/z 326 and 324 (MH⁺), 308 and 306 (MH⁺ – H₂O), 192 and 190 (5-bromocytosine).

***Trans*-(4S,5S)-N1-(2'-Deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine (4).** HPLC (Polarity, octadecylsilyl silica gel, H₂O), k' = 2.2, ¹H NMR analysis (600 MHz, DMSO-d₆), δ 7.10 (s, 1H, NH), 7.40 (s, 1H, NH), δ 6.62 (d, 1H, OH₄, $J_{\text{OH4,H4}} = 5.6$ Hz), δ 6.25 (d, 1H, OH₅, $J_{\text{OH5,H5}} = 8.5$ Hz), δ 5.57 (dd, 1H, H_{1'}, $J_{1',2'} = 8.3$ Hz, $J_{1',2''} = 6.3$ Hz), δ 5.05 (d, 1H, H₄), δ 4.94 (d, 1H, OH_{3'}, $J_{\text{OH3',H3'}} = 4.1$ Hz), δ 4.66 (d, 1H, H₅), δ 4.64 (t, 1H, OH_{5'}, $J_{\text{OH5',H5'}} = J_{\text{OH5',H5''}} = 5.5$ Hz), δ 4.01 (m, 1H, H_{3'}, $J_{2',3'} = 6.1$ Hz, $J_{2'',3'} = 3.0$ Hz), δ 3.51 (m, H_{4'}, $J_{3',4'} = 3.1$ Hz, $J_{4',5'} = 3.7$ Hz, $J_{4',5''} = 5.2$ Hz), δ 3.28 (m, 2H, H_{5'}), δ 2.21 (m, 1H, H_{2'}, $J_{2',2''} = -13.4$ Hz), δ 1.73 (m, 1H, H_{2''}), ¹³C NMR analysis (75,5 MHz, DMSO-d₆), δ 154.85 (C₂=O), δ 152.78 (C₆=O), δ 82.35 (C_{1'}), δ 86.29 (C_{4'}), δ 82.03 (C₅), δ 80.88 (C₄), δ 70.82 (C_{3'}), δ 62.41 (C_{5'}), δ 37.63 (C_{2'}).

***Trans*-(4R,5R)-N1-(2'-Deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine (5).** HPLC (Polarity, octadecylsilyl silica gel, H₂O), k' = 2.5, ¹H NMR analysis (600 MHz, DMSO-d₆), δ 7.22 (d, 2H, NH₂), δ 6.60 (d, 1H, OH₄, $J_{\text{OH4,H4}} = 6.0$ Hz), δ 6.23 (d, 1H, OH₅, $J_{\text{OH5,H5}} = 6.2$ Hz), δ 5.47 (pst, 1H, H_{1'}, $J_{1',2'} = 7.1$ Hz, $J_{1',2''} = 6.4$ Hz), δ 5.24 (d, 1H, H₄), δ 5.18 (d, 1H, OH_{3'}, $J_{\text{OH3',H3'}} = 3.6$ Hz), δ 4.66 (d, 1H, H₅), δ 4.82 (t, 1H, OH_{5'}, $J_{\text{OH5',H5'}} = J_{\text{OH5',H5''}} = 5.2$ Hz), δ 4.07 (m, 1H, H_{3'}, $J_{2',3'} = 5.9$ Hz, $J_{2'',3'} = 3.4$ Hz), δ 3.55 (m, H_{4'}, $J_{3',4'} = 3.3$ Hz, $J_{4',5'} = 4.0$ Hz, $J_{4',5''} = 4.1$ Hz), δ 3.32 (m, 2H, H_{5'}), δ 2.20 (m, 1H, H_{2'}, $J_{2',2''} = -13.2$ Hz), δ 1.80 (m, 1H, H_{2''}), ¹³C NMR analysis (75,5 MHz, DMSO-d₆) δ 154.84 (C₂=O), δ 152.71 (C₆=O), δ 82.87 (C_{1'}), δ 86.50 (C_{4'}), δ 82.10 (C₅), δ 81.53 (C₄), δ 71.12 (C_{3'}), δ 61.84 (C_{5'}), δ 36.52 (C_{2'}).

***Cis*-(4R,5S)-N1-(2'-Deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine (6).** HPLC (Polarity, octadecylsilyl silica gel, H₂O), k' = 2.9, ¹H NMR analysis

(600 MHz, DMSO- d_6), δ 7.15 (d, 2H, NH_2), δ 6.63 (d, 1H, OH_4 , $J_{OH_4,H_4} = 6.8$ Hz), δ 5.81 (d, 1H, OH_5 , $J_{OH_5,H_5} = 10.4$ Hz), δ 5.43 (dd, 1H, $H_{1'}$, $J_{1',2'} = 8.0$ Hz, $J_{1',2''} = 6.5$ Hz), δ 5.37 (dd, 1H, H_4 , $J_{4,5} = 5.4$ Hz), δ 5.14 (d, 1H, $OH_{3'}$, $J_{OH_{3'},H_{3'}} = 4.1$ Hz), δ 5.1 (dd, 1H, H_5), δ 4.59 (t, 1H, $OH_{5'}$, $J_{OH_{5'},H_{5'}} = 5.7$ Hz, $J_{OH_{5'},H_{5''}} = 6.0$ Hz), δ 4.17 (m, 1H, $H_{3'}$, $J_{2',3'} = 6.2$ Hz, $J_{2'',3'} = 2.9$ Hz), δ 3.59 (m, $H_{4'}$, $J_{3',4'} = 2.8$ Hz, $J_{4',5'} = 5.1$ Hz, $J_{4',5''} = 5.5$ Hz), δ 3.37 (m, 2H, $H_{5'}$), δ 2.53 (m, 1H, $H_{2'}$, $J_{2',2''} = -13.2$ Hz), δ 1.75 (m, 1H, $H_{2''}$), ^{13}C NMR analysis (75,5 MHz, DMSO- d_6) δ 154.55 ($C_2=O$), δ 152.89 ($C_6=O$), δ 82.61 ($C_{1'}$), δ 86.63 ($C_{4'}$), δ 77.35 (C_5), δ 74.73 (C_4), δ 71.24 ($C_{3'}$), δ 62.50 ($C_{5'}$), δ 35.21 ($C_{2'}$).

***Cis*-(4S,5R)-N1-(2'-Deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine (7).** (Polarity, octadecylsilyl silica gel, H_2O), $k' = 3.4$, 1H NMR analysis (600 MHz, DMSO- d_6), δ 7.22 (d, 2H, NH_2), δ 6.67 (d, 1H, OH_4 , $J_{OH_4,H_4} = 5.7$ Hz), δ 5.60 (pst, 1H, $H_{1'}$, $J_{1',2'} = 6.8$ Hz, $J_{1',2''} = 6.4$ Hz), δ 5.59 (d, 1H, OH_5 , $J_{OH_5,H_5} = 10.7$ Hz), δ 5.25 (dd, 1H, H_4 , $J_{4,5} = 5.8$ Hz), δ 5.09 (dd, 1H, H_5), δ 4.89 (d, 1H, $OH_{3'}$, $J_{OH_{3'},H_{3'}} = 4.2$ Hz), δ 4.56 (t, 1H, $OH_{5'}$, $J_{OH_{5'},H_{5'}} = 5.6$ Hz, $J_{OH_{5'},H_{5''}} = 5.8$ Hz), δ 4.01 (m, 1H, $H_{3'}$, $J_{2',3'} = 6.4$ Hz, $J_{2'',3'} = 4.3$ Hz), δ 3.59 (m, $H_{4'}$, $J_{3',4'} = 3.9$ Hz, $J_{4',5'} = 4.8$ Hz, $J_{4',5''} = 5.8$ Hz), δ 3.27 (m, 2H, $H_{5'}$), δ 2.44 (m, 1H, $H_{2'}$, $J_{2',2''} = -13.2$ Hz), δ 1.71 (m, 1H, $H_{2''}$), ^{13}C NMR analysis (75,5 MHz, DMSO- d_6) δ 154.85 ($C_2=O$), δ 152.78 ($C_6=O$), δ 82.67 ($C_{1'}$), δ 86.25 ($C_{4'}$), δ 75.62 (C_5), δ 74.47 (C_4), δ 70.40 ($C_{3'}$), δ 62.15 ($C_{5'}$), δ 36.81 ($C_{2'}$).

Interconversion of 1-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine products (4-7). Purified diastereomers were dissolved separately in 25 mM phosphate buffer at pH 5.5, 7.0 and 9.0 and their decomposition, as well as the formation of other diastereomers, was monitored as a function

of time at 37°C. The separation of all four diastereomers was achieved by HPLC using a octadodecylsilyl silica gel 5 μm particle size column (0.4 x 25 cm, Polarity, Waters) with 50 mM phosphate buffer (pH 5.5) at 1.4 ml/min as the mobile phase.

Results and Discussion

Preparation of dCyd Bromohydrins

The first step in the synthesis of 1-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine nucleosides involved the preparation of dCyd bromohydrins (Scheme 1). The bromination of dCyd has been applied to various pyrimidines as a means to study their oxidation.²⁰⁻²⁴ In general, the bromination of pyrimidines in aqueous solution results in the formation of two diastereomers with Br at C5 and OH at C6, both in a trans configuration.^{14,21,25,26} Similarly, the bromination of dCyd gave two bromohydrin products by HPLC analysis. The configuration of the two bromohydrins (6S or 6R) was assigned by comparison of the HPLC and NMR features to the corresponding bromohydrins of thymidine, 2'-deoxyuridine, and 5-methyl-2'-deoxycytidine.^{25,27,28} The early and late eluting peaks were assigned as the 6S and 6R diastereomers, respectively. Similar to other pyrimidine bromohydrins, the 6S diastereomer eluted before the 6R diastereomer on reversed phase chromatography and the early eluting 6S diastereomer was formed in approximately half the yield of the late eluting 6R diastereomer. The ¹H-NMR of the two dCyd bromohydrins depicted eight signals in D₂O, which were assigned to the base and sugar moieties. The stereochemistry of the two products was discerned by the different coupling constants for the sugar protons, in particular, the coupling constant of 1' and 2' dramatically changes depending on the configuration of the C6 carbon. The presence of a bulky substituent, such as an hydroxyl group, with a S configuration at C6 induce a significant shift in the conformation of the sugar moiety from 2'-endo to 2'-exo, leading to 1-2 Hz increases in the coupling constant for H1' and H2'. On the basis of NMR analysis, the early eluting bromohydrin of dCyd depicted a coupling constant ($J_{1'2'}$) of 8.8 Hz and thus can be assigned as the 6S diastereomer, whereas the late eluting product depicted a coupling constant of 7.3 Hz, and

thus, it was the 6S diastereomer. Because of the differences between $J_{1'2'}$ and $J_{1'2''}$, the 6S diastereomers depicted a doublet of doublet (difference of 2 Hz) while the 6R diastereomers depict a pseudo triplet (difference of 1 Hz) in the ^1H -NMR spectra. The same features are observed in pyrimidine bromohydrins, 5,6-glycols, and hydroperoxides.^{14,20} Further evidence for the structure of dCyd bromohydrins is provided by LC/MS analysis. These analysis depicted molecular ion peaks at 324 and 326 m/z (MH⁺; 1:2 ratio of ^{81}Br and ^{79}Br stable isotopes) accompanied with fragment ion peaks at 308 and 306 m/z, consistent with loss of H₂O from the molecular ion, and at 192 and 190 m/z, consistent with loss of the deoxyribose moiety.

Structural assignment of the four N1-(2'-Deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine (4-7). ^1H NMR analysis of (4-7). The four carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine diastereoisomer were assigned by ^1H NMR, ^{13}C NMR, COSY and NOESY experiments. The ^1H NMR in DMSO exhibit 14 signals assigned to H_{1'}, H_{2'}, H_{2''}, H_{3'}, H_{4'}, H_{5'}, H_{5''}, H₄, H₅, OH_{3'}, OH_{5'}, OH₄, OH₅ and NH₂ on the C₆ of the base. In addition to the COSY experiment, the OH and NH₂ were assigned by addition of D₂O that is traduced by the lost of ^1H NMR signal for these exchangeable protons. The diastereoisomers 5S (4,6) and 5R (5,7) (the C5 of bromohydrin is renumber as the C4 in carbamoyl as for the C6 that become C5, scheme 1) were assigned as for the bromohydrin and confirmed by NOESY (will be discuss later) with the highest $J_{1'2'} = 8.3$ Hz for (4) and 8.0 Hz for (6) that correspond to the 5S isomers and 7.1 Hz for (5) and 6.8 Hz for (7) that correspond to the 5R isomers with a difference of 1.2 Hz for each trans and cis group. The vicinal protons H₄ and H₅ in the cis isomers (6,7) formed a doublet with a coupling constant about 5 Hz that is not observed for the trans isomers (4,5) expose by the Karplus equation that predicted the lowest coupling constant at angle 90° between the two vicinal proton that can only attributed to the trans isomers because of the

restriction angle created by the pentose cycle. The same trend $^1\text{H-NMR}$ in D_2O were observed for the chemical synthesis of trans-1-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2oxo-imidazolidine base where a coupling constant of $J_{4,5} = 6 \text{ Hz}$ was observed in the cis isomer whereas the trans isomers don't have any coupling between the C4 and C5 proton.²⁹ Furthermore, as for the bromohydrin, a doublet of doublet is observed for the anomeric proton of the 5S carbamoyl isomers and a pseudotriplet is observed for the 5R carbamoyl isomers. The protons of the carbamoyl amino group are distinctly unequivalent and exhibit a chemical shift difference that can be attributed to restriction of rotation on the C-N bond. This restriction is a consequence of a hydrogen bonding between the exocyclic amino and C6 carbonyl groups.¹⁹ Furthermore, in the case of the carbamoyldihydroxyoxoimidazolidine a other hydrogen bonding is possible between the exocyclic NH_2 and the O_2 that will explain the 13° angle of the amino group observed by cristallographic studies.³⁰

^{13}C NMR analysis of (4-7). The chemical shift for ^{13}C NMR was assigned on comparison with the thymidine hydroperoxide and the 5-MedCyds glycols.²⁷ All sugar carbon have the same chemical shift (table 3), the difference between the carbamoyl and the 5-MedCyd glycols was at C4 (C5 for 5-MedCyd) were the N4 amino group doesn't produce the same as C4 ketone shielding effect that move at upper field the C5 of the 5-MedCyd glycols and for this way is more similar as the thymidine glycols.²⁵ A strong difference of 5 ppm upper field at C4 and C5 is observed for the cis isomers (6,7) compared to the trans (4,5), this difference between cis and trans isomer is similar to ^{13}C NMR of the 5-MedCyt glycols isomers and his attributable to the formation of hydrogen bond between C5 and C6 hydroxyl group in the cis isomers.²⁷

Conformational analysis of (4-7). The conformations of the furanose and exocyclic hydroxymethyl groups were estimated from the NMR coupling constants for. The 2'-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl ring was assumed to adopt an equilibrium between two stable pseudo rotational cycle between 2'-exo-3'-endo and 2'-endo-3'-exo form.^{31,32} These two stable conformation restrict the orientation of proton on the sugar such as the $J_{1',2'} + J_{3',4'} \approx 10 \text{ Hz}$, $J_{2',3'} \approx J_{3',4'}$ and $J_{1',2'} \approx J_{2',3'}$. The ^1H NMR spectra analysis revealed for the products (4-7) reside predominantly in the 2'-endo-3'-exo form, that is expected for deoxyribonucleoside derivative compared to the ribonucleotide that reside more in the 2'-exo-3'-endo form.^{22,33} Furthermore, the C2' endo conformation is enhanced for the carbamoyl-dihydroxy-oxoimidizalodine in 5S configuration as observed for the 5MetdCyd glycols or 5MetdCyd bromohydrins and was inferred at an increase of $J_{1',2'}$ coupling constant and the decrease in the $J_{2',3'}$ and $J_{3',4'}$ constant for the 5S isomer.²⁷ A difference in 2'-exo-3'-endo population between 5S and 5R isomer was revealed by a shift from 26-27% (6,4) to 32-38% (5,7) respectively (table 3), and are supported by a strong similarity of the thymidine hydroperoxyde isomers.²⁵ For the exocyclic hydroxymethyl group at C4', three stable rotamer are expected and classified the OH_{5'} as gauche-gauche ($g^+(\psi)$), gauche-trans ($t(\psi)$), trans-gauche ($g^-(\psi)$) in order to the cyclic O in the furanose ring and C3'.²² Differences are observed in the position of the hydroxymethyl group between the trans isomers (4,5) that are at 46-53% in $g^+(\psi)$ rotamer compared to the cis (6,7) that are more in the $g^-(\psi)$ at 40-43%. The possible H bonding between the hydroxymethyl group with the C5 hydroxyl group of the base could explain this difference on rotamers percentage and 2'-exo \rightleftharpoons 3'-exo percentage configuration.

Stereochemistry of dCyd imidazolidine products(4-7)

A spatial coupling is observed between the 4OH and the 5H as for the 4H and 5OH of the trans isomer (4-5) that is not observed for the cis isomers (6-7) and is attributed that the OH and H of the adjacent carbon are at the same side thus closer to each other in the trans (figure 2, table 1). A coupling is observed between the exocyclic hydroxymethyl C4' group and the C5 OH group of the (5-7) isomers that is stronger for the (5) and (7) isomers that is attribute to the 5R isomer. The trans isomers, to have a angle near 90° between the 4H and 5H, the molecule adops a non-planar imidazolidine ring. This is correlated by crystalline studies on the base of 1-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine, relate that is not a planar molecule with the C5 getting out of the plane about of 0.18Å for the trans 4R,5R (5) isomer³⁰ and is the opposite for the trans 4S,5S isomer (4) to respect the 90° in the imidazolidine ring (figure 2),³⁴ this trends of half chair is also observed for the the two stable cis thymine glycols.³¹ For (4), the only configuration possible where no interaction is observed between the 5'OH and the 4-OH as 5'OH and 5OH is the trans 5S (4) in opposite to the trans 5R (5) where an expected interaction between the 5'OH exocyclic and the two 4OH and 5 OH of the base is observed. For the cis isomers, no interaction between 4H et 5OH as well 5H and 4OH that mean the molecule is almost planar to maximize this two distance. This could be explain by the optimization of the hydrogen bonding between the 5OH and 4OH. This is supported by interaction observed between 4SOH and 5'OH that is not observed with the 4ROH due to the longest distance made by the C1' angle with the base.

Stereochemical synthesis of the *N*1-(2-Deoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine (4-7). The decomposition of the two trans isomers of 6-hydroperoxy-(5,6)-dihydroxy-2'-deoxycytidine (I) (scheme 1) give, in majority, the two cis

isomers of *N*1-(2-deoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine (**4-7**) separated by reverse and normal phase HPLC and characterized by ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^1H COSY and NOESY experiments.^{20,27,35} The conversion of dCyd bromohydrin into 6-hydroperoxy-(5,6)-dihydroxy-2'-deoxycytidine (**I**) (scheme 1) by H_2O_2 treatment are very unstable and decompose into a stereospecific way to give at more than 95%, in the case of the *trans*-(5*S*,6*S*)-5-bromo-6-hydroxy-5,6-dihydro-2'-deoxycytidine (**2**) the *trans*-(4*R*,5*R*)-*N*1-(2-deoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine (**5**); and the *trans*-(5*R*,6*R*)-5-bromo-6-hydroxy-5,6-dihydro-2'-deoxycytidine (**3**) give the *trans*-(4*S*,5*S*)-*N*1-(2-deoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine (**4**), both reaction correspond to a inversion of configuration at C4 and C5 compared to the initial dCyd bromohydrin (dCyd C5 correspond to C4 of carbamoyl, and the dCyd C6 was rename C5). The more stables 6-hydroperoxide-5-hydroxy-5,6-dihydro-thymidine produced by bromine aqueous treatment followed by a addition of H_2O_2 in presence of Ag_2O lead preferentially with a 10-fold greater yield formation of the *cis* hydroperoxides with a inversion of configuration at C5 and a retention of configuration at C6, has been observed for the formation of uracil or cytosine glycols synthesized by the bromohydrin intermediate and converted in water by Ag_2O .^{20,21,25,35,36} Furthermore, the formation of uracil glycols have been produce by synthesis of the hydroperoxide derivative formed by the same two steps as the hydroperoxide formed here and followed by a reduction that give the absolute configuration that revealed a retention of configuration at C6 and a inversion of configuration at C5.³⁵ The mechanism was attributed to the lost of the Br traduced by a epoxide intermediate were the 6 OH is transfer to the C5 with a inversion of configuration followed by formation of a zwitterion that favorised the attack of a nucleophilic reagent such H_2O or H_2O_2 at the same side by polar interaction or this

polar interaction favoured the cis isomer form by the chain ring tautomerism process between N4-C6, that is revealed by a retention of configuration at C6 with inversion at C5 in pyrimidine and a retention of configuration at C5 with a inversion at C4 for the carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine.^{14,20,21,25,35} The difference observed in diastereomers trans formed in the purified bromohydrin mixture and the cis diastereomers in the non-purified bromohydrins is attributed to the pH that will be discussed latter in the carbamoyl decomposition kinetic. But briefly, the purification of the bromohydrin in water as for effect to change the pH 6-7 and at this pH the cis isomers are very unstable and interconvert with a epimerisation N1-C5 at more then 99 % to give the trans isomers with a inversion of configuration at C5 that explain the observation on the purified bromohydrin in water. In the non purified bromohydrin mixture, the pH is about 3, resulting from depletion of hydroxyl species that added to the cytosine during bromohydrin formation, the cis isomers are more stable at acidic pH (table 4) thus explain it predominant formation from the conversion of the non purified bromohydrins mixture in 5-hydroxy-6-hydroperoxide. The formation of the carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine is different in the nucleobase compare to the base experiment, in the base experiment, a C4 open aldehyde intermediate followed by a recycle mechanism to form the carbamoyl-dihydroxy-oxoimidazolidine base was proofed by isotopic experiment.³⁷ For the nucleobase, the stereochemistry is kept for each bromohydrin, that means a concerted mechanism implicating the attack of the N3 on the C5 that is opposed to the hydroperoxide bridge between C6-C4 (scheme 4) that is opening at the same moment to leave a C6 hydroxy and the C4 carbonyl.

Interconversion of N1-(2-Deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine (4-7). The four imidazolidine diastereomers (4-7) interconverted by ring-opening tautomerism at N1-C5 and/or N3-C4 (Scheme 2). The rate of isomerization for cis (4R,5S) (6) was dependent on pH (Table 4). At pH 5.5 and 7.0, the cis (4R,5S) diastereomer (6) mainly converted into the trans (4R,5R) diastereomer (5) with rates of 0.22 and 2.27 h⁻¹ at 37°C, respectively. In contrast, there was a mixture of cis (4R,5S) and trans (4R,5R) diastereomers (5 and 6) at initial times of incubation at pH 9 and at 37°C. This mixture transformed into a mixture containing all four diastereomers, indicating ring-chain tautomerism not only at N1-C5 but also at N3-C4. At pH 5.5 and 7.0, a minor amount of all four diastereomers was observed ($\geq 1\%$). The cis (4S,5R) diastereomer (7) was least stable, converting into the trans (4S,5S) (4) at pH 5.5 and 37°C with a rate of 3.8×10^{-1} h⁻¹ by ring chain tautomerism at N1-C5. At pH 7, more than 95% of the cis (4S,5R) (7) had transformed into the trans (4S,5S) diastereomer (4) at initial times, and similar to the other cis diastereomer, cis (4R,5S), the mixture degenerated into a mixture of the diastereomers at pH 9. Again, this indicates that the cis diastereomers undergo two ring-chain tautomerisms at N1-C5 and at the N3-C4. The trans diastereomers were the most stable. Thus, at pH 5.5, the two trans diastereomers converted into the corresponding cis diastereomers by N1-C5 ring-chain tautomerism with rates of 2.7×10^{-3} h⁻¹ for trans (4S,5S) (4) to cis (4S,5R) (7) isomerization and 4.8×10^{-3} h⁻¹ for trans (4R,5R) (5) to cis (4R,5S) (6) isomerization. However, ring-chain tautomerism at N3-C4 increased at neutral pH, for example, the conversion of trans (4S,5S) diastereomer (4) into trans (4R,5R) diastereomer (5) occurred with rates of 1.8×10^{-2} h⁻¹ at pH 7 and 1.5×10^{-1} h⁻¹ at pH 9, presumably by way of an intermediate cis (4R,5S) diastereomer (6) that was too unstable at neutral pH. The other trans (4R,5R) diastereomer (5) behaved in a similar way giving rise to the trans (4S,5S) diastereomer

(4) via the cis diastereomer, with rates of $1.8 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$ at pH 7 and $1.1 \times 10^{-1} \text{ h}^{-1}$ at pH 9. The isomerization of imidazolidine products is analogous to that of 5,6-saturated pyrimidines with a OH at C6, including 5,6-diols of thymine, uracil and cytosine derivatives, as well as photohydrates of uracil and cytosine derivatives. The difference with imidazolidine products is that ring-chain tautomerism occurs at a second site resulting in the interconversion of all diastereomers. The well-known isomerization involves formation of an open carbonyl at C6 that converts to a hemiacetal after a nucleophilic attack of water and protonation of N1. This results in a open chain ureid with geminal diol groups that can subsequently recycle to form two diastereomers. This mechanism was proven by ^{18}OH isotopic exchange experiments with thymine glycols.²¹ The same process has been observed for cytosine glycols in which the trans diastereomer undergo ring-chain tautomerism into the more stable cis glycols.²⁰ The lower rate of isomerization at N3-C4 compared to that at N1-C5 of imidazolidine diastereomers may be attributed to difference in the environment of hydroxyl groups at C4 and C5, in particular, the presence of the carbonyl group next to C4 appears to stabilize the N3-C4 bond toward ring-chain tautomerism. Such stabilization may be due to the formation of a hydrogen bridge between the C4OH and the carbonyl group of the carbonyl group. The loss of the proton on the hydroxyl group should accelerate the formation of an open-ring ketone intermediate as postulated for the isomerization of pyrimidines 5,6-diols. Furthermore, the two distinct protons of the exocyclic amino group observed in ^1H -NMR indicate strong hydrogen bonding between these protons and the C2 and C6 carbonyl groups. The trans diastereomers were more stable than the cis probably because of steric repulsion between the two vicinal OH at C4 and C5. A small amount of a more less polar product was also observed in the decomposition of imidazolidine products at basic pH

and was characterized by $^1\text{H-NMR}$ as biuret. This product may arise from the attack of water during isomerization resulting in the loss of dialdehyde.

Conclusion

The addition of hydroxyl radicals to 2'-deoxycytidine as a free nucleoside or within small oligonucleotides results in the predominant formation (90%) of C5-OH-cytidin-6-yl radicals that subsequently convert into the corresponding peroxy radicals after addition of a molecule of oxygen.⁹ The latter peroxy radicals transform into intermediate hydroperoxides and endoperoxides that lead to the formation of imidazolidine products. In the present work, the bromohydrins of 2'-deoxycytidine and converted directly into hydroxperoxides to avoid the complicated chemistry of peroxy radicals that undergo decomposition by bimolecular pathways. It should be noted that peroxy radicals transform mainly into hydroperoxides in DNA because bimolecular decay pathways are not likely in the polymer. In addition, the use of bromohydrins minimizes the involvement of metal ions that can reduce intermediate hydroperoxides to glycols as shown in the case of the thymidine hydroperoxide.²⁵ The mechanism of formation of imidazolidine products is probably concerted because each bromohydrin diastereomer gave a specific imidazolidine products involving the attack on the C4 by the N3 and followed by cleavage to produce the final products with a retention of configuration at C5 and inversion of configuration at C4. The order of stability for imidazolidine diastereomers was: trans (4S,5S) (**4**) \geq trans (4R,5R) (**5**) \gg cis (4R,5S) (**6**) $>$ cis (4S,5R) (**7**). The stability was greater than the 5S compared 5R diastereomers, in agreement with studies of thymidine glycols.³⁶ In contrast, the greatest difference in stability was observed between trans and cis diastereomers such that the trans diastereomers were 75-fold more stable than the cis diastereomers.

Acknowledgments

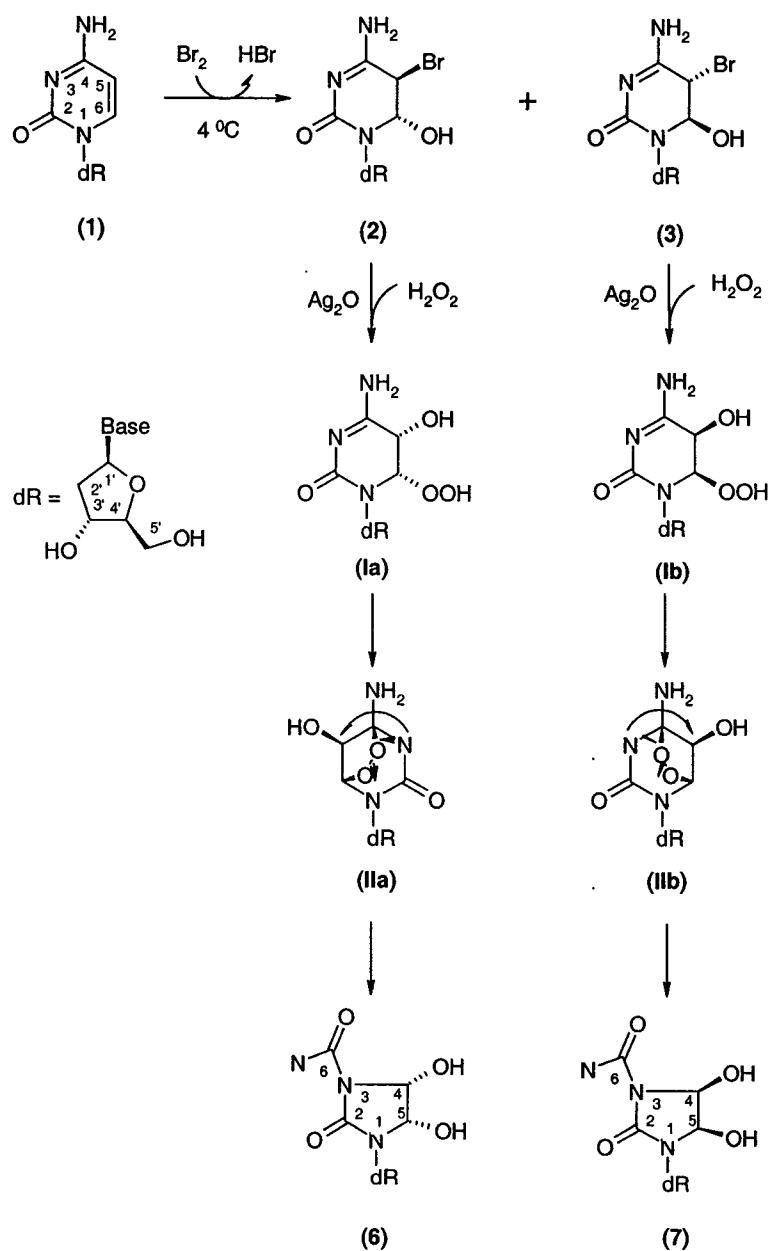
We would like to thank François Bergeron for his support in the ^{13}C NMR analysis. This study was supported by the Cancer Research Society, Inc, Canada.

Reference List

1. Wiseman, H.; Halliwell, B. *Biochem. J.* **1996**, *313* (Pt 1), 17-29.
2. Ames, B. N. *Mutat. Res.* **1989**, *214*, 41-46.
3. Loeb, K. R.; Loeb, L. A. *Carcinogenesis* **2000**, *21*(3), 379-385.
4. Van Remmen, H.; Hamilton, M. L.; Richardson, A. *Exerc Sport Sci Rev* **2003**, *31*(3), 149-153.
5. Gilchrest A. Barbara; Bohr A. Vilhelm *FASEB J.* **1997**, *11*, 322-330.
6. Hamilton, M. L.; Van Remmen, H.; Drake, J. A.; Yang, H.; Guo, Z. M.; Kewitt, K.; Walter, C. A.; Richardson, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*(18), 10469-10474.
7. Beckman, K. B.; Ames, B. N. *Physiological Reviews* **1998**, *78*(2), 547-581.
8. von Sonntag, C. *Chemical Basis of Radiation Biology*; von Sonntag C.; Taylors & Francis London: London, 1987.
9. Hazra, D. K.; Steenken, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*(13), 4380-4386.
10. Cooke, M. S.; Evans, M. D.; Dizdaroglu, M.; Lunec, J. *FASEB J* **2003**, *17*(10), 1195-1214.
11. Cadet, J.; Berger, M.; Douki, T.; Ravanat, J. L. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **1997**, *131*, 1-87.
12. Wang, D.; Kreutzer, D. A.; Essigmann, J. M. *Mutat. Res.* **1998**, *400*(1-2), 99-115.
13. Kreutzer, D. A.; Essigmann, J. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*(7), 3578-3582.
14. Wagner, J. R.; Decarroz, C.; Berger, M.; Cadet, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*(17), 4101-4110.
15. Polverelli, M.; Teoule, R. *Z Naturforsch [C]* **1974**, *29*(1), 16-8.
16. Teoule, R.; Cadet, J. *Mol Biol Biochem Biophys* **1978**, *27*, 171-203.
17. Wagner, J. R. *J. Chim. Phys. Phys.-Chim. Biol.* **1994**, *91*(7-8), 1280-1286.
18. Paul, C. R.; Wallace, J. C.; Alderfer, J. L.; Box, H. C. *Int J Radiat Biol* **1988**, *54*(3), 403-415.
19. Paul, C. R.; Arakali, A. V.; Wallace, J. C.; McReynolds, J.; Box, H. C. *Radiat Res* **1987**, *112*(3), 464-77.
20. Tremblay, S. ; Douki, T.; Cadet, J.; Wagner, J. R. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*(30), 20833-20838.
21. Cadet, J.; Teoule, R.; Ulrich, J. *Tetrahedron* **1975**, *31*, 2057-2061.
22. Cadet, J.; Ducoulomb, R.; Hruska, F. E. *Biochim. Biophys. Acta* **1979**, *563*(1), 206-215.
23. Ducolomb, R. ; Cadet, J.; Taieb, C.; Teoule, R. *Biochim Biophys Acta* **1976**, *432*(1), 18-27.
24. Cadet, J.; Teoule, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*(20), 6517-6519.
25. Wagner, J. R.; Vanlier, J. E.; Berger, M.; Cadet, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*(6), 2235-2242.
26. Ross SA; Burrows CJ *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*(16), 2805-2808.

27. Bienvenu, C. ; Cadet, J. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*(8), 2632-2637.
28. Cadet, J.; Taieb, C.; Remin, M.; Niemczura, W. P.; Hruska, F. E. *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, *608*(2), 435-445.
29. Leonard, N. J.; Wiemer, D. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*(25), 8218-8221.
30. Hahn, B. S.; Wang, S. Y.; Flippen, J. L.; Karle, I. L. *J Am Chem Soc* **1973**, *95*(8), 2711-2712.
31. Altona, C.; Sundaralingam, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*(7), 2333-2344.
32. Altona, C.; Sundaralingam, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*(23), 8205-8212.
33. Dalton, J. G.; George, A. L.; Hruska, F. E.; McGaig, T. N.; Ogilvie, K. K.; Pelling, J.; Wood, D. J. *Biochim Biophys Acta* **1977**, *478*(3), 261-73.
34. Flippen, J. L. *Acta Crystallographica* **1973**, *B29* , 1756-1762.
35. Decarroz , C. *Thesis* **1987**, 238 p.
36. Lustig, M. J.; Cadet, J.; Boorstein, R. J.; Teebor, G. W. *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*(18), 4839-4845.
37. Polverelli, M.; Teoule, R. *Z Naturforsch [C]* **1974**, *29*(1), 12-5.

Scheme 1. Preparation of *N*1-(2-deoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine by bromohydrin dCyd formation followed by a conversion into 6-hydroperoxy-5-hydroxy-5,6-dihydro-2'-deoxycytidine.



Scheme 2. Interconversion mechanism of the four *N*1-(2-deoxy- β -D-*erythro*-pentofuranosyl)-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine in phosphate buffered solution at different pH and 37°C.

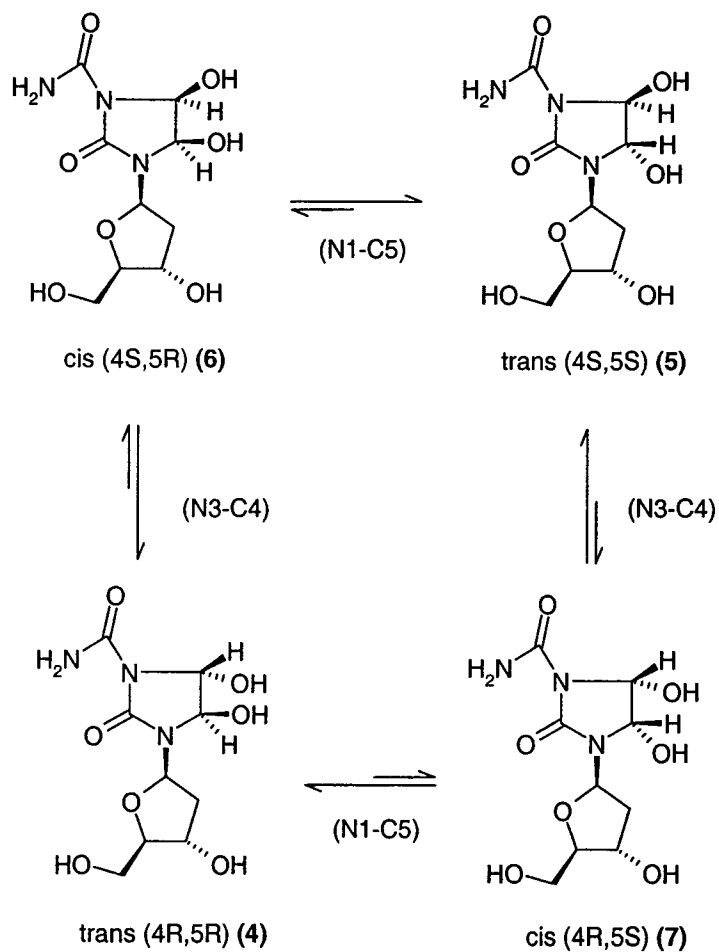


Table 1. Characteristic interactions in NOESY analysis for the *N1*-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine isomers (**4-7**) in DMSO-d₆ at 600MHz

	1'-2'H	2'H-3'H	2''H-3'H	2'H-5OH	3'OH-2''H	5'OH-4OH	5'OH-5OH	4OH-5H	4H-5OH
<i>trans</i> (4S,5S) (4)	+	+++	++	+	++	-	-	+	+++
<i>trans</i> (4R,5R) (5)	-	-	++	-	+	++	++++	+	++
<i>cis</i> (4R,5S) (6)	-	+	-	-	-	-	+++	-	-
<i>cis</i> (4S,5R) (7)	-	++	-	-	+	+++	++++	-	-

The + or - is indicating the strenght of the signal observed: - equal no signal, + equal a weak signal, ++ equal a moderate signal, +++ equal a strong signal, ++++ equal a very strong signal.

Table 2. ^{13}C NMR chemical shift value for the *N*1-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine isomers (**4-7**) in DMSO-d₆ at 75,5MHz

	δ C2 ppm	δ C4 ppm	δ C5 ppm	δ C6 ppm	δ C1' ppm	δ C2' ppm	δ C3' ppm	δ C4' ppm	δ C5' ppm
Trans (4S,5S) (4)	154.85	80.88	82.03	152.78	82.35	37.63	70.82	86.29	62.41
Trans (4R,5R) (5)	154.84	81.53	82.10	152.71	82.87	36.52	71.12	86.50	61.84
Cis (4R,5S) (6)	154.55	74.73	77.35	152.89	82.61	35.21	71.24	86.63	62.50
Cis (4S,5R) (7)	154.85	74.47	75.62	152.78	82.67	36.81	70.40	86.25	62.15

Table 3. Population of C2'exo \rightleftharpoons C3'exo and the conformation of the exocyclic hydroxymethyl of the 2'-deoxy- β -D-penfuransyl residue for the N1-(2-deoxy- β -D-*erythro*-pentofuransyl)-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine isomers.

Population	% 2'-exo-3'-endo	% g ⁺ (ψ)	% t (ψ)	% g ⁻ (ψ)
Trans (4S,5S) (4)	27.2	45.5	17.5	37.0
Trans (4R,5R) (5)	31.7	53.1	26.0	20.9
Cis (4R,5S) (6)	25.9	29.6	40.0	30.4
Cis (4S,5R) (7)	37.9	29.6	43.0	27.4

Percentage % 2'-exo-3'-endo = $100 \times J_{3'4'}/J_{1'2'} + J_{3'4'}$. % g⁺(ψ) = $13.75 - (J_{4'5'} + J_{4'5''})/10.65$. % t(ψ) = $J_{4'5''} - 1.5/10$. % g⁻(ψ) = % g⁺(ψ) - % t(ψ).^{22,31,32}

Table 4. Decomposition rate of the four *N*1-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine isomers in 50 mM phosphate buffer at different pH and 37°C.

	pH 5.5 k(h ⁻¹)	pH 7.0 k(h ⁻¹)	pH 9.0 k(h ⁻¹)
Trans (4S,5S) (4)	2.7x10 ⁻³	1.8x10 ⁻²	0.15
Trans (4R,5R) (5)	4.8x10 ⁻³	1.8x10 ⁻²	0.11
Cis (4R,5S) (6)	0.22	2.27	N.D.
Cis (5S,4R) (7)	0.34	N.D.	N.D.

Figure 1. HPLC chromatographic separation of the four *N*1-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine isomers.

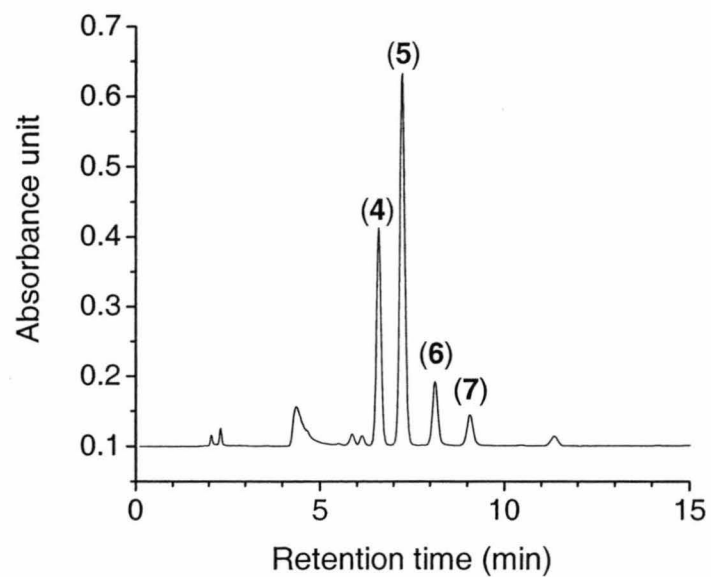


Figure 2. ^1H -NMR NOESY spectrum of the *trans*-(4*S*,5*S*)-*N*1-(2-deoxy- β -D-erythro-pentofuranosyl)-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine (**4**) in DMSO- d_6 at 600 MHz.

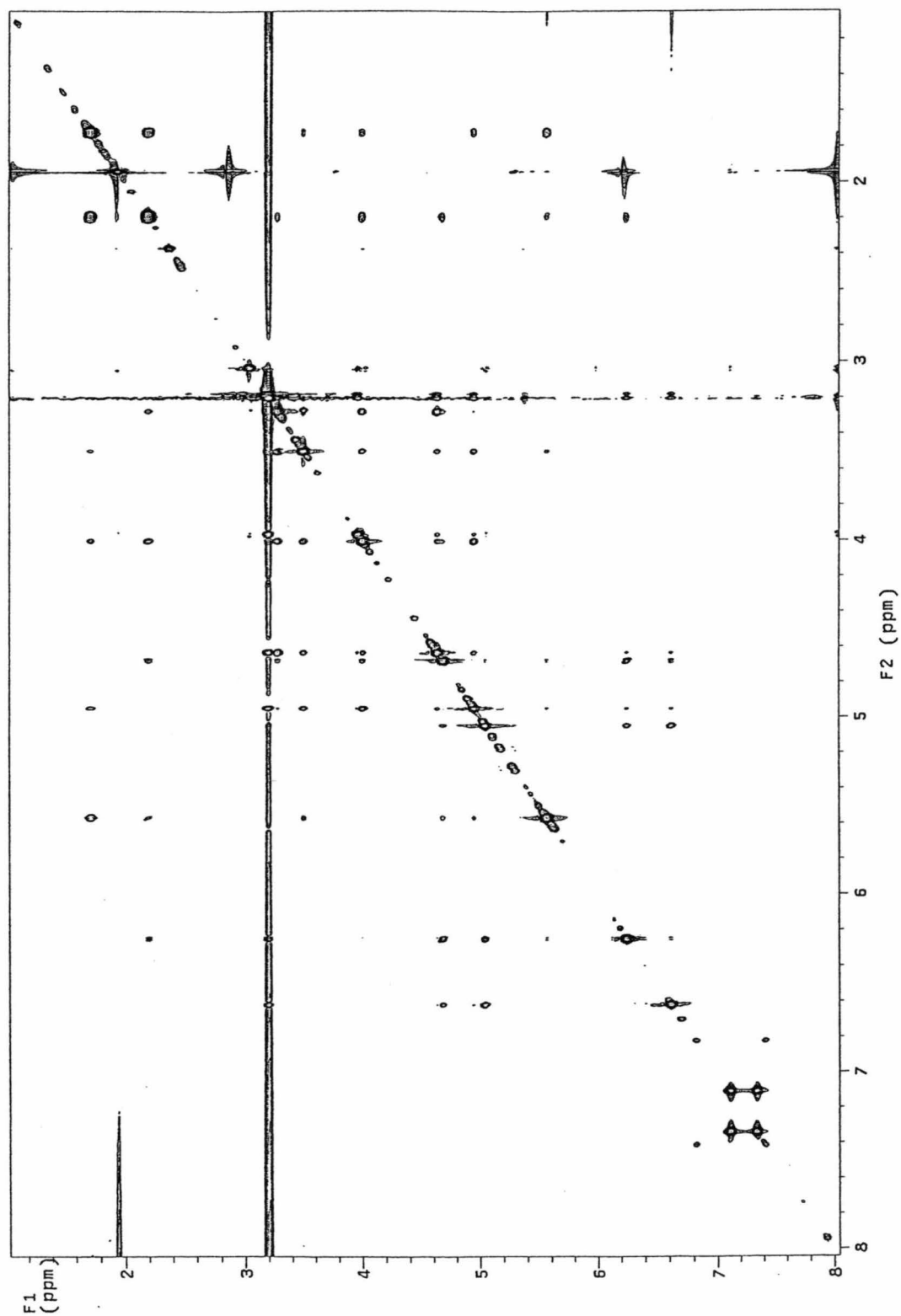
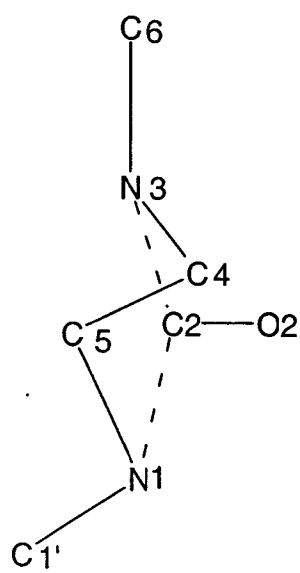
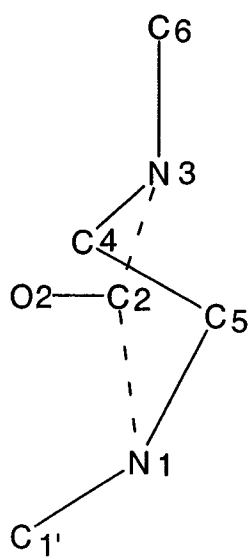


Figure 3. Schematic view of the base of (4-5).



trans 5R,6R



trans 5S,6S

Chapitre V – Discussion

La formation des diols de dCyd à la suite d'une attaque par le radical hydroxyle est fortement considérée en raison de la formation des diols de dUrd issue de leur désamination et de la formation du oh^5dCyd provenant de leur déshydratation. De plus, l'oxydation par réaction de Fenton ou par irradiation dans un milieu aqueux oxygéné de d'autres pyrimidines, soit comme nucléosides libres ou comme bases libres, tels : la thymidine, la thymine, la 5-MedCyd, l'uracile et la 1,3-diméthyluracile vont former de façon prédominante la forme diol de ceux-ci (Bhattacharyya & Mandal, 1983; Burdzy et al., 2002; Decarroz et al., 1986; Ito et al., 1984; Schuchmann & von Sonntag, 1983; Theruvathu et al., 2001; Varghese, 1975; von Sonntag, 1987; Zuo et al., 1995). Il est estimé que plus de 40% des produits de décomposition issue de l'attaque du radical hydroxyle sur la dCyd forme les diols de dCyd (Wagner et al., 1999). Toutefois, en raison de leur grande labilité, leur dosage ainsi que les effets biologiques ont été reliés à leurs produits de décomposition soit : le oh^5dCyd , les diols de dUrd et le oh^5dUrd (Kreutzer & Essigmann, 1998). Nos travaux ont pour but de déterminer la stabilité des diols sous différentes formes (nucléoside libre, ADN simple brin et double brin), d'étudier ces processus de décomposition et ainsi que leur réparation.

Formation des diols de dCyd

Synthèse des bromohydrines

Les résultats obtenus du chapitre 2, nous démontrent qu'il est possible de synthétiser les diols de dCyd sous la forme de nucléosides libres à partir des bromohydrines et de les convertir par l'addition d'oxyde d'argent. Cette méthode a déjà

été utilisée pour la formation des hydroperoxydes, des diols de thymidine et pour la formation des diols de 5-MedCyd (Bienvenu & Cadet, 1996; Wagner et al., 1994). La formation des bromohydrines par l'ajout de Br₂ en solution aqueuse, qui sont ensuite séparées par CHLP/UV et caractérisés par RMN ¹H ainsi que CL-IPA-SMSM. Ceci résulte en l'addition d'un atome de brome sur le groupement éthylénique C5-C6 qui forme un pont et ensuite suit d'une attaque d'un nucléophile (H₂O ou H₂O₂) en C6 et causer l'ouverture du pont pour former deux bromohydrines trans dont le stéréoisomère majoritaire est le *trans*-(5R,6R)-5-bromo-6-hydroxy-5,6-dihydro-2'-dCyd (2x plus formé) ce qui est corrélé avec des études sur la formation des bromohydrines de thymidine, de 5-MedCyd et dUrd (Bienvenu & Cadet, 1996; Decarroz, 1987).

Synthèse et stéréochimie des diols de dCyd

Le processus de formation des diols de pyrimidines par l'intermédiaire d'un dérivé halogéné tel le brome a été caractérisé dans une étude similaire par addition d'oxygène isotopique stable (¹⁸O) en C6 sur la thymine. Cette étude a démontré que la conversion du bromohydrine en diols dans une solution aqueuse se fait par une attaque concertée intramoléculaire du côté opposé au groupement partant pour former un intermédiaire époxyde dû à un réarrangement anionotropique et qui se traduit par l'apparition de l'oxygène marqué en C5 avec une inversion de configuration (Cadet et al., 1975). Ce processus en deux étapes de conversion de une des bromohydrines en diols donne majoritairement les diols cis avec une inversion de configuration en C5 et une rétention de configuration en C6. Cette inversion de configuration en C5 et la rétention de configuration en C6 est observée les diols de dCyd ainsi que les diols d'autres pyrimidines formées par cette synthèse impliquant la formation d'un intermédiaire

bromohydrine tels : les diols de dUrd et les diols de 5-MedCyd (Bienvenu & Cadet, 1996; Decarroz , 1987). La rétention de configuration en C6, suppose la formation d'un intermédiaire zwiterion qui normalement devrait former les deux isomères (cis et trans), toutefois des interactions polaires entre le OH en C5 et le groupement nucléophile (soit H_2O pour les diols ou H_2O_2 pour les hydroperoxydes), va favoriser l'addition du nucléophile du même côté que le groupement hydroxyle en C5 suivit d'une déprotonation pour former le diol de dCyd cis (voir schéma 2 du chapitre 2). De plus, si l'attaque du nucléophile avait lieu sur l'époxyde cyclique, seul les trans pourraient être formés, ce dû à l'encombrement stérique causé par l'époxyde. Dans le cas des diols, l'utilisation d' $^{18}OH_2$ lors de la bromation, aurait permis de prouver hors de tout doute la formation de l'époxyde par son transfert sur le C5.

Tautomérie chaîne cycle

Le processus tautomérie entre le N1-C6 a été caractérisé sur les diols de thymidine et 5-MedCyd marqués à l'oxygène 18 en C6 ce qui a permis de mettre en évidence un processus de tautomérie chaîne cycle. Ce processus passe par un intermédiaire ouvert cétonique suivi par l'attaque de l'eau en C6 pour former un hémiacétal qui déshydrate pour reformer l'intermédiaire cétonique. Par la suite, cet intermédiaire cétonique, recyclise soit par une attaque d'un côté ou de l'autre sur le groupement N1 pour reformer dans un cas le diol de départ et dans le second le deuxième diastéréoisomère ce processus qui en résulte par la perte de l'oxygène marqué avec le temps (Cadet et al., 1975; Lustig et al., 1992). Ce processus de tautomérie se traduit par une rétention de configuration en C5 et une inversion en C6 impliquant un processus de tautomérie entre le N1-C6 pour former le produit trans (voir le schéma 5).

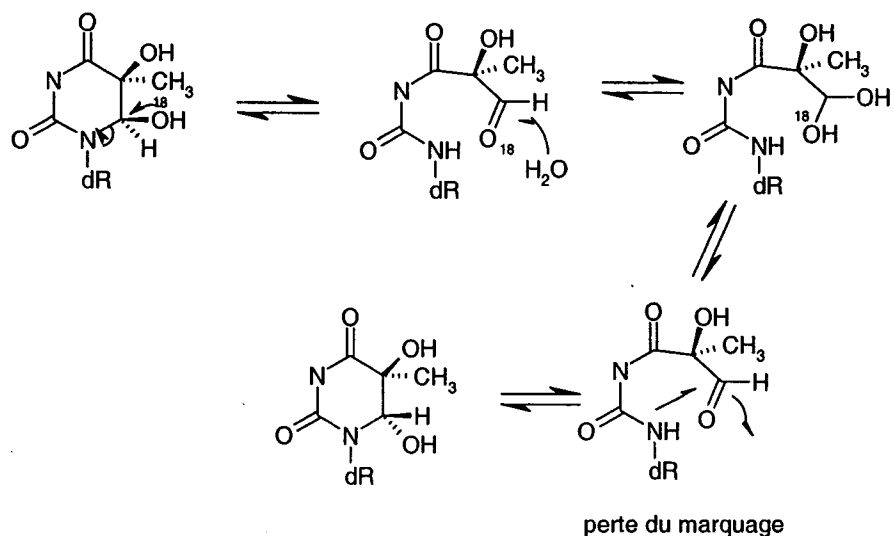


Schéma 5 : Mécanisme proposé pour l'épimérisation du diol de dCyd à partir des études sur le diol et de thymidine marquée à l'oxygène ^{18}O (schématisé ci-dessus)(Cadet et al, 1975)

Toutefois l'isomère trans qui est plus instable, redonnera par le même mécanisme le cis original, mais avec la perte du marquage en C6. Ce processus est aussi observé dans le cas des diols de dCyd où les produits majoritairement formés à partir de chaque bromohydrine sont des diastéréoisomères cis, toutefois les trans formés en faible quantité, lorsque purifiés par CHLP se convertissent en cis. Tout comme dans la section portée à la stéréochimie des diols de dCyd, l'utilisation d'un marquage avec $^{18}\text{OH}_2$ aurait permis d'étudier directement ce processus de tautométrie chaîne cycle des diols de dCyd. L'utilisation de $^{18}\text{OH}_2$ lors de la conversion de chaque bromohydrine en diols, aurait permis de marquer le groupement hydroxyle en C6 et par la suite de suivre la perte du marqueur. Néanmoins, la purification CHLP d'un isomère (Cadet et al., 1975) trans de diol de dCyd a converti en un seul isomère cis (données non publiées), ce qui est accord avec les observations sur les diols de Thd et de 5-MedCyd (Ducolomb et al., 1976;

Jolibois et al., 1996; Lustig et al., 1992). La déshydratation rapide des diols de dCyd aurait toutefois été une limitation dans ce type d'étude.

Décomposition des diols de dCyd

En fonction du pH et sel

Les études de décomposition sur les nucléosides de diols de dCyd ont été menées sur le diastéréoisomère *cis*-(5*S*,6*R*)-dihydroxy-(5,6)-dihydro-2'-dCyd pour des raisons de rendements et de séparation, étant l'isomère le plus formé et ayant la plus grande rétention sur CHLP C-18. L'effet du pH sur la décomposition du diol de dCyd montre un processus de déshydratation prédominant entre les pH 4 et 9 où le diol convertit de façon quantitative en oh^5dCyd ($\geq 90\%$). À des pH supérieurs à 9, le processus de déshydratation est toujours présent, toutefois la conversion du diol en oh^5dCyd n'est plus quantitative ce qui implique un second processus de décomposition qui ne se traduit pas par l'apparition de diol de dUrd, ce qui exclut le processus de désamination, mais plutôt un processus de fragmentation de la base qui est observé chez les diols de thymidine ainsi que sur les diols de dUrd et qui laisse un résidu urée sur le sucre tandis que les dérivé 5-hydroxypyrimidines sont peu réactifs en milieu basique (chapitre 3) (Ide et al., 1985; Ide et al., 1985). Les vitesses de réactions atteignent un maximum vers un pH entre 4-5 et est environ 2.5 fois plus rapide qu'à pH physiologique, pour atteindre un minimum à pH 9. Les temps de demi-vie varient entre 10 à 90 minutes pour un temps de demi-vie de 50 minutes à pH et température physiologique (voir figure 3 dans le chapitre 2).

Comparaison entre le photohydrate de dCyd et le diol de dCyd

La courbe de décomposition des diols en fonction du pH est parfaitement similaire à celle du photohydrate de dCyd caractérisé par Johns. Le photohydrate qui ne se différencie que

par le remplacement du groupement hydroxyle en position C5 par un hydrogène, décompose par les mêmes processus que les diols, soit par déshydratation et désamination, de plus le rapport entre la déshydratation et la désamination (9 :1) est similaire pour le diol de dCyd que le photohydrate dCyd entre les pH 4 et 9 (Johns et al., 1965). Une augmentation de la vitesse de décomposition du diol de dCyd est aussi observée chez le photohydrate de dCyd (voir figure 3 dans le chapitre 2). De plus, autant pour le photohydrate dCyd que le diol de dCyd, la vitesse de déshydratation est dépendante de la force ionique (voir figure 4 dans le chapitre 2). DeBoer a démontré que le processus de déshydratation du photohydrate est orchestré par une catalyse acide-base qui peut être associée au diol de dCyd vu les fortes similitudes dans les structures et les processus de décompositions entre les deux composés (DeBoer et al., 1970). Le photohydrate, tout comme le diol de dCyd, atteint un maximum de déshydratation vers pH 5 et est attribué à une catalyse acide-base qui est expliquée par DeBoer comme le résultat de la protonation du N3 à un pH inférieur à 6 et qui accélère l'interaction avec la base conjuguée du tampon. Toutefois à des pH plus bas que 5, une diminution de la base conjuguée du tampon et donc les taux de déshydratation diminuent aussi (voir schéma 6). Ce qui supporte ce mécanisme est qu'en absence de tampon, dans l'étude d'effet du pH sur la déshydratation, dans le modèle théorique il y a perte du mécanisme 4 (encerclé en bleu et ligne bleue du schéma 6) qui se traduit par l'absence du pic à pH 5 qui est observée dans le modèle expérimental (DeBoer et al., 1970). Les photohydrates dCyd, comme d'autres dommages à l'ADN, montre une stabilisation par la double hélice de l'ADN d'environ 37 fois (Boorstein et al., 1990; O'Donnell et al., 1994). Les grandes similitudes entre les deux dommages à la dCyd, nous laissent supposer que les diols de

dCyd seront aussi stabilisés dans l'ADN d'où l'intérêt de générer les diols de dCyd dans celui-ci.

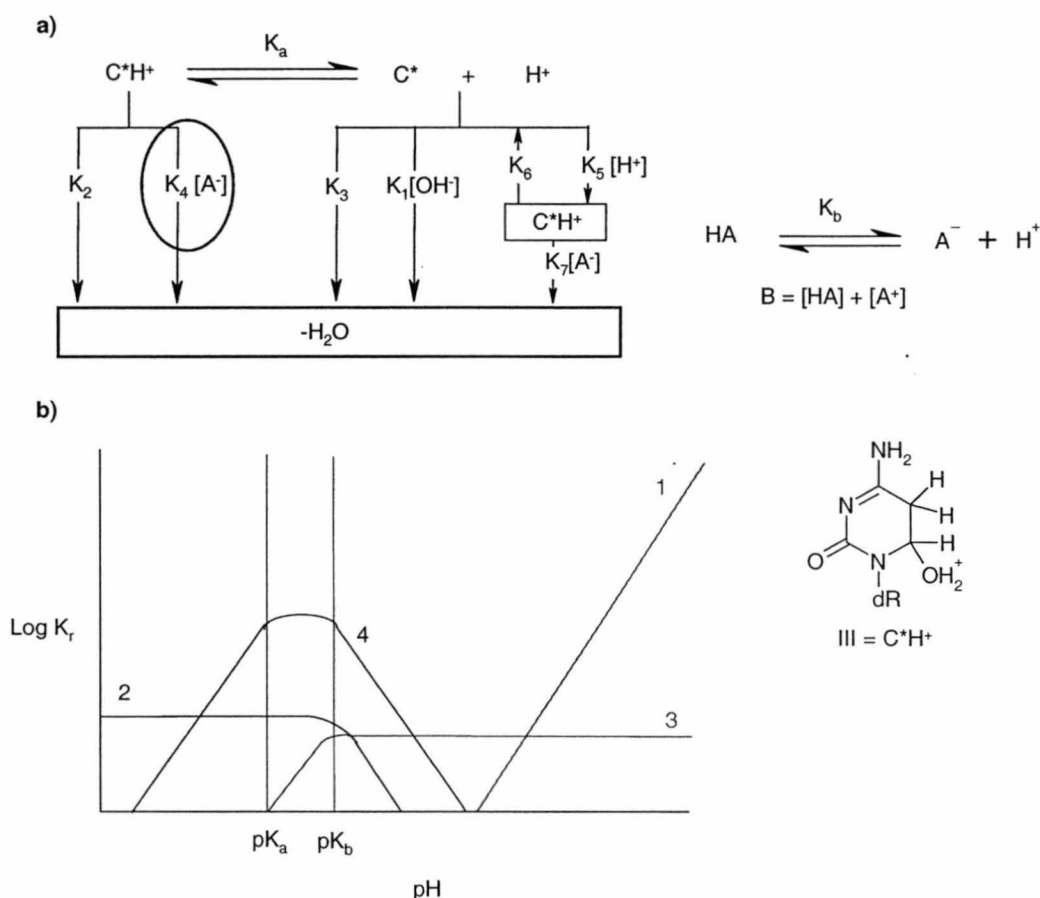


Schéma 6. Catalyse basique de la déshydratation des photohydrates de dCyd

a) Modèle de catalyse du processus de déshydratation proposé par DeBoer (DeBoer et al., 1970). b) La vitesse de déshydratation (K_r) est la somme des quatre processus exprimés en a).

Pour prouver hors de tout doute que ce processus est le même dans le cas des diols de dCyd, la purification CHLP devrait se faire dans l'eau sans tampon suivi d'une étude de décomposition en fonction du pH. Une autre façon est de changer pour des tampons avec des pK_b différents. De plus, il serait intéressant de former les trois autres stéréoisomères des diols de dCyd comme nucléoside libre pour étudier leur vitesse de décomposition

ainsi que les processus impliqués (pourcentage de désamination versus déshydratation). Il serait aussi possible à partir des nucléosides libres de déterminer leur structure exacte par RMN ^1H , COSY, NOESY, ^{13}C et également de déterminer certaines constantes thermodynamiques et l'énergie d'activation par des études de décomposition en fonction de la température.

Hydrolyse de l'ADN

La quantité limitée de diols de dCyd formés dans l'ADN ne permet pas la détection directe par des méthodes analytiques connues. De plus, l'absence d'anticorps spécifiques dirigés contre les diols de dCyd élimine la possibilité d'une analyse sur un ADN double brin entier. Toutefois, la synthèse chimique du diol de dCyd, nous a permis d'étudier différentes conditions et systèmes d'analyses afin d'élaborer un système de détection adéquat.

L'étude des dommages dans l'ADN nécessite l'hydrolyse du polymère en monomère qui par la suite peuvent être séparé des bases normales par des méthodes chromatographiques conventionnelles tels CHLP et CG, les diols dCyd étant très instables, une méthode indirecte de détection a dû être mise au point. Dans cette étude nous avons mis en évidence que l'hydrolyse par l'acide formique à 145°C du diol de dCyd forme quantitativement à plus de 90% la base oh^5Cyt avec moins de 10% de désamination, de plus le 10% observé peut-être attribué, en partie, à la faible quantité de diol de dUrd formé lors de la synthèse du diol de dCyd et non au processus d'hydrolyse en tant que tel. L'hydrolyse acide du oh^5dCyd donne quantitativement le oh^5Cyt sans désamination, donc le oh^5Cyt observé dans le système des bases se résume comme étant la somme des diols de dCyd et oh^5dCyd présents. Le même processus se produit pour la

oh⁵dUrd et le diol de dUrd qui dans ces conditions donnent quantitativement le oh⁵Ura (Douki et al., 1996b). L'avantage de ces deux produits est qu'ils sont actifs à l'électrochimie permettant une détection quantitative avec une limite près de 50 fmoles et de plus il est possible de standardiser avec les bases normales détectées par UV. L'hydrolyse enzymatique de l'ADN peut aussi être utilisée. Dans ces conditions, les diols de dCyd et le oh⁵dCyd convertit quantitativement en oh⁵dCyd, tandis que les diols de dUrd sont résistants à l'hydrolyse enzymatique et ainsi seul le oh⁵dUrd digéré est détecté par cette méthode. Le même système de détection est utilisé pour l'analyse des oh⁵dCyd et oh⁵dUrd que pour le oh⁵Cyt et le oh⁵Ura et la différence de niveau détecté entre le oh⁵Ura et le oh⁵dUrd nous permet d'évaluer la quantité de diol de dUrd présent dans l'ADN oxydé.

Formation et décomposition des diols de dCyd dans l'ADN

Comme il a été mentionné dans le chapitre 1, il est estimé que l'oxydation par le radical hydroxyle sur la dCyd conduit à la formation de diol de dCyd à environ 40% ou du moins il est un intermédiaire majeur après une attaque par ce radical (Bjelland & Seeberg, 2003; Chabita et al., 1996; Wagner et al., 1999). Néanmoins aucune détection soit par une méthode directe ou indirecte n'a mis en évidence la présence des diols de dCyd. Pour ce faire, l'oxydation d'un thymus de veau a été effectué en présence de Fe²⁺ et d'H₂O₂ qui est un système bien connu de générer le radical hydroxyle par réaction de Fenton (chapitre 1). L'incubation à 37°C et pH 7 de l'ADN oxydé par réaction de Fenton, est analysé par hydrolyse acide et montre une diminution du oh⁵Cyt égale à l'augmentation du oh⁵Ura que l'on attribue au processus de désamination (voir figure 5 dans le chapitre 2). En sachant que la oh⁵dCyd en solution ne désamine pas (chapitre 3), la perte du oh⁵Cyt qui a

la même vitesse que l'apparition du oh^5Ura et ne peut-être attribuée qu'à la désamination des diols de dCyd en diols de dUrd. À temps infini, les quantités finales de oh^5Cyt et oh^5Ura sont respectivement évaluées à 1140 et 700 fmoles respectivement pour un rapport entre la déshydratation et la désamination de 62 : 38. La vitesse de décomposition a été évaluée, dans le chapitre II, à $2.5 \times 10^{-2}h^{-1}$ ($9.6 \times 10^{-3}h^{-1} \times 1/0.38$) pour un temps de demi-vie de 28 heures. Toutefois, dans cette estimation, il n'a pas été tenu en compte que les deux processus sont compétitifs, donc que par le fait même les deux processus sont indissociables et que le taux de $9.6 \times 10^{-3}h^{-1}$ observé est directement relié à la décomposition des diols de dCyd ce qui donne alors un temps de demi-vie réel estimé à 72 heures. Ces résultats indiquent une augmentation de la stabilité des diols de 34 à 85 fois supérieure dans l'ADN double brin versus le nucléoside libre et qui est en accord avec ceux obtenus sur les photohydrates avec une augmentation de stabilité de 37 fois dans le polymère double brin, poly dG-dC (Boorstein et al., 1990). Une différence entre le diol de dCyd et le photohydrate dCyd que l'on observe, est un changement dans le processus de décomposition favorisant la désamination dans l'ADN versus en nucléoside libre passant de moins de 10% à environ 30% pour le cas des diols comparé à 10% de désamination pour le photohydrate peu importe qu'il soit en nucléoside libre ou en double brin. La désamination du diol de dCyd dans l'ADN peut être légèrement surestimé vue qu'une quantité de oh^5Ura est présente au départ et que l'on assume qu'il y a initialement 100% de diols de dCyd et dUrd.

Implications biologiques

Le taux de désamination des diols de dCyd est $9.6 \times 10^{-3}h^{-1}$ ce qui est 4 millions de fois plus rapide que la désamination thermique estimé à $2.5 \times 10^{-9} h^{-1}$ (Frederico et

al., 1990), ce qui montre l'effet de l'oxydation sur la vitesse de désamination de la dCyd qui est largement augmentée lorsque le lien 5-6 est saturé tout comme la 5-MedCyd et les photohydrates dCyd (voir chapitre 1) (Bienvenu & Cadet, 1996; Boorstein et al., 1990). La quantité de oh^5dCyd observée dans des études ont estimé que dans des lymphocytes humains, le taux basal est de 2.9 oh^5dCyd par millions de dCyd (Lenton et al., 1999). Donc si l'on assume que 30 % du processus de décomposition des diols de dCyd est associé à la désamination, l'effet de quantité de substrat disponible pour la désamination thermique qui est 1 million de fois supérieures (abondance de dCyd comparée à l'abondance des diols de dCyd), est contre balancé par la rapidité de la désamination causée par le stress oxydatif. De plus les taux observés de oh^5dCyd dans les lymphocytes humains sont ceux stationnaires après réparation, tandis que l'estimation de Frederico sont des valeurs in vitro où aucune réparation n'est effectuée. Il est estimé que 28 000 dommages oxydatifs par cellules par jours chez l'homme (voir page 10 dans le chapitre 1), d'où il est possible d'estimer que 1000 désaminations seront causées par le stress oxydatif par cellule humaine par jour, ce qui est près du double des 100 à 500 estimés par Lindahl (Lindahl, 1993) pour la désamination thermique, et montre l'importance du stress oxydatif sur la désamination de la dCyd dans la mutagenèse et montre la nécessité que des enzymes de réparations soient activent devant ce dommage.

Modèle spécifique de réparation du diol de dCyd dans un polymère double brin.

L'utilisation d'oxydants spécifiques qui ajoutent deux groupements hydroxyles vicinaux sur des liaisons éthyléniques des pyrimidines a été largement utilisée pour former des diols de thymidine et de 5-MedCyd, mais n'ont jamais été utilisé pour former

spécifiquement les diols de dCyd (Fritzsche et al., 1987; Hayatsu, 1996; Iida & Hayatsu, 1970; Iida & Hayatsu, 1971b; Nawamura et al., 1994). Le permanganate de potassium (KMnO_4) et l'osmium tétraoxyde (OsO_4) sont des oxydants qui saturent le lien éthylénique pour former des diols cis vicinaux en position 5-6 sur les pyrimidines (Wiberg & Saegbarth, 1957). Cette solution a été approchée parce que la formation spécifique des diols de dCyd dans un ADN double brin qui ne peut être effectuée à partir des diols synthétisés comme monomères et introduits par la suite dans un oligonucléotide et ce dû à leurs instabilités. De plus, la réactivité des nucléosides en tant que monomère face au KMnO_4 est bien connue et peut être classée comme suit Thd>dUrd, 5MedCyd>>dCyd>>dGuo>dAdo (Bui & Cotton, 2002; Burton & Riley, 1966; Hayatsu, 1996; Hayatsu et al., 1991). La forte réactivité de la thymidine face au KMnO_4 qui est plus de 20 fois supérieur à celle de la dCyd et 100 fois supérieur à la dGuo, est un inconvénient parce qu'il forme les diols de Thd qui sont de très bon substrat pour endo III (D'Ham et al., 1999; Hatahet et al., 1994; Nawamura et al., 1994). Pour remédier à ce problème, l'utilisation d'un hétéroduplexe poly dG-dC et de poly dI-dC, est idéale pour maximiser la formation des diols de dCyd et de minimiser les dommages potentiels aux autres bases dû à la plus faible réactivité des purines face au KMnO_4 . Ces limitations dû à l'instabilité et à la synthèse des diols de dCyd nuisent à l'élaboration d'un modèle portant le dommage unique et donc a empêché jusqu'à maintenant les études de réparation et mutagénèse à l'intérieur de systèmes biologiques vivants. Seul deux études générant spécifiquement des diols de pyrimidines (thymine, cytosine) montre un spectre mutagène C T (voir section I.6 p.34). Toutefois aucune caractérisation directe n'a pu identifier si les diols de dCyd étaient la cause de cette transition ou plutôt ces produits de décompositions.

Formation des diols de dCyd et dUrd dans les polymères poly GC et IC

Effet de temps sur la formation des diols de dCyd

Oxydation dans le temps du poly dG-dC et du poly dI-dC montre une formation de oh^5Cyt linéaire en fonction du temps qui est aussi observé sur le nucléoside libre de dCyd (Bui & Cotton, 2002; Hayatsu, 1996). Toutefois, une grande différence dans la vitesse de réaction est observée entre le polymère et le nucléoside libre. Cette vitesse de réaction est linéaire avec le temps dans les deux cas, mais ne donne que 0.5 à 1 % (6000-10000 dommages/ 10^6 cytosines) de dommages à la cytosine après deux heures de réaction dans le polymère double brin comparé à 60 % en une heure pour la cytosine en solution (Bui & Cotton, 2002). Cette différence de réactivité face à la forme nucléoside libre et ADN double brin a déjà été observée et est utilisé comme technique de détection de mésappariement de bases (Lambrinakos et al., 1999).

Effet de sel sur la formation des diols de dCyd

L'addition de sel se traduit par une augmentation de la réactivité du KMnO_4 dans les deux polymères, ce qui concorde avec les données obtenues par Hansler qui a déterminé que cette faible réactivité dans l'ADN double brin était causé par la répulsion électrostatique entre les phosphates chargés négativement sur l'ADN et le réactif MnO_4 anionique (Hansler & Rokita, 1993). Une différence marquée dans le taux de formation du oh^5Cyt en fonction de la quantité de sel qui est plus bas pour une faible quantité de sel comparé à une forte concentration de sel est observés dans le poly dG-dC et pas dans le poly dI-dC (voir figure 3 dans le chapitre 3). Cette augmentation accrue de la réactivité est observé à une concentration supérieur à 2M NaCl et qui correspond à une transition de la forme B-ADN à Z-ADN déjà observé dans un poly dG-dC à 2.1M NaCl à pH 7 (Loprete

& Hartman, 1993; Pohl & Jovin, 1972). Un changement vers la forme Z va conduire à une meilleure susceptibilité d'oxydation car dans cette forme les bases sont plus exposées à la solution. Cet effet n'est pas observé dans le poly dI-dC parce qu'à ces concentrations de sel la transition B-ADN vers Z-ADN n'est pas observée (Miskovsky et al., 1993).

Caractérisation des diols de dCyd

La détection directe des diols de dCyd ne peut être possible dû à son instabilité durant les conditions de digestion du polymère et d'analyses, toutefois les caractéristiques des ses produits de décomposition permettent d'en détecter la présence. Premièrement, l'incubation du poly dG-dC oxydé par le KMnO_4 dans des conditions physiologiques de température et de pH, montre une diminution du oh^5Cyt avec une demi-vie de 6.6 h et qui est corrélée par une augmentation quantitative du oh^5Ura . Après plusieurs demi-vies un plateau est atteint où les niveaux de oh^5Cyt et oh^5Ura sont stables et ce même si chauffé à 60°C pour plusieurs heures, ce qui indique que le oh^5Cyt ne désamine pas en oh^5Ura . Donc la conversion du oh^5Cyt en oh^5Ura à des temps plus courts ne peut qu'être attribuée aux diols de dCyd. De plus, le oh^5Ura observé par l'hydrolyse acide, n'apparaît pas dans l'hydrolyse enzymatique et indique que seul les diols de dUrd sont présent ce qui est corrélé par les résultats obtenus de l'hydrolyse basique détruisant spécifiquement les diols de dUrd et non les 5-hydroxypyrimidines. Donc l'augmentation du oh^5Ura directement associé à l'augmentation des diols de dUrd et non au oh^5dUrd , ne peut qu'être associé à la désamination des diols de dCyd. La présence de oh^5dCyd est peu probable lors de l'oxydation au KMnO_4 dû au faible potentiel d'oxydation de sa double liaison qui est inférieur aux bases normales et est donc plus susceptible de réagir (Riviere et al., 2004). Ce phénomène a déjà été observé pour la oh^5dCyd , la oh^5dUrd et la 8-oxo-

7,8-dihydrodGuo dans des oligonucléotides double brin qui sont spécifiquement détruit par le KMnO_4 (Fujimoto et al., 1997; Inoue H et al., 1997; Terashima et al., 1999; Wolfe et al., 2002). Le dernier point qui appuie la présence des diols de dCyd s'observe dans les différences de vitesses d'excision de oh^5Cyt par endo III 6 fois supérieures un polymère fraîchement oxydé contrairement à celui incubé à 37°C où les diols de dCyd ont converti en oh^5dCyd . La diminution de 20% de oh^5dCyd dans ce dernier ne peut expliquer cette différence et l'hypothèse la plus plausible est un changement dans le substrat, soit des diols de dCyd en oh^5dCyd , dont les diols de dCyd seraient bien meilleurs substrats pour endo III que le oh^5dCyd , ce qui sera approfondi dans la prochaine section.

Excision par endo III des dommages dans des polymères oxydés par KMnO_4

Une différence marquée dans l'excision par endo III du oh^5Cyt est observée entre les polymères fraîchement oxydés où convertis thermiquement. Pour le polymère poly dG-dC, le pourcentage d'excision passe de 17.8 % pour le polymère fraîchement oxydé à 3.8 % pour le polymère incubé, ce qui correspond à une diminution d'un facteur 4.7. Tandis que le pourcentage d'excision des dommages convertis en produits de désamination des diols demeure sensiblement le même (23.3% à 24.5 % respectivement). Cette différence est attribuée à la conversion des diols de dCyd par le traitement thermique qui a convertit 80% des diols de dCyd en oh^5dCyd et 20% en diols de dUrd. Pour le cas du poly dI-dC, une diminution du pourcentage d'excision est aussi observée mais moins marquée (3.2 fois moins) et est probablement causée par une plus grande quantité de oh^5Cyt comparé aux diols de dCyd dans le polymère frais. Aucune donnée n'est disponible dans la littérature sur la différence d'excision entre les diols de dCyd et la oh^5Cyt . Toutefois, les différentes études ayant comparées les diols de dUrd et le oh^5dUrd

montre une différence d'excision des diols de dUrd de 2.3 fois plus élevé que les diols de Thd (Purmal et al., 1998) qui eux sont excisés 7 fois plus efficacement que le oh^5dCyd (D'Ham et al., 1999; Hatahet et al., 1994). Cette grande efficacité d'excision des diols de dUrd comparé à la oh^5Cyt est en accord avec nos résultats sur le poly dG-dC ($24.5/3.8 = 6.4$) et dans le poly dI-dC ($36.4/4.4 = 8.3$). Toutefois, l'équipe d'Essigmann a trouvé une faible différence entre l'excision du diol de dUrd et la oh^5dCyd par endo III (1.4 fois) (Wang & Essigmann, 1997). Cette excision rapide du diol de dCyd suggère que la cellule minimise les effets délétères mutagènes de la désaminations du diol de dCyd en diol de dUrd par prévention à sa formation.

L'analyse CG-SM du mélange d'excision par endo III sur le poly dG-dC et poly dI-dC oxydés, a détecté la présence de l'isomère cis de diol Ura provenant de la conversion des diols de dCyd dans l'ADN par désamination en diols de dUrd, du oh^5Cyt provenant de la déshydratation des diols de dCyd soit avant ou après l'excision par endo II et du oh^5Ura . L'apparition dans le mélange d'excision d'endo III de oh^5Ura qui n'est pas formé dans les polymères oxydés, implique une conversion soit par l'enzyme ou par le processus de dérivation. Dans les conditions expérimentales, la dérivation des standards de diols de dUrd en présence des sels nécessaires à endo III entraîne leur déshydratation partielle, toutefois il est possible que l'excision par endo III soit aussi responsable de cette déshydratation qui pourrait être expliqué par les conditions plus basiques à l'intérieur du site actif d'endo III causé par une lysine chargée positivement. De plus, une plus grande excision des diols de dUrd cis comparée aux trans est observée et s'explique par le fait que $KMnO_4$ génère des diols de type cis qui sont aussi les plus stables dans le cas des diols de Thd, les diols de dCyd et les diols de 5-MedCyd (cis :trans = 10 :1) (Bienvenu &

Cadet, 1996; Jolibois et al., 1996; Tremblay et al., 1999). Le processus de désamination ne change pas la stéréochimie sur le C5 et C6 et montre que les diols de dCyd formés sont de type cis, ce qui concorde avec son mécanisme de formation par le KMnO_4 . Une étude récente a démontré, dans le cas des diols de Thd, que les diastéréoisomères cis 6S étaient excisés plus rapidement par endo III que les cis 6R dans des oligonucléotides doubles brins (Grollman, 2004), toutefois en ce qui concerne les diols, en raison de la méthode d'analyse utilisée (CG-MS), les diols de dCyd cis 6S et cis 6R ne sont pas séparés, et donc nous il n'avons été impossible d'étudier un tel effet.

Formation des 5-hydroxy-6-hydroperoxy-5,6-dihydro-2'-dCyd

Les 1-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxo-imidazolidines

Le dérivé 1-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxo-imidazolidine, est le produit majoritairement formé par la radiolyse gamma de la cytosine en solution aqueuse (Hahn et al 1973, Poverelli, 1983) qui a été caractérisé par RMN ^1H et ^{13}C . Quatre diastéréoisomères sont possibles, dont deux synthétisés par Leonard mais un processus de tautomérie rapide en N1-C5, conduit de façon préférentielle au trans (Leonard & Wiemer, 1976). Ils ont aussi été détectés à des faibles niveaux par l'excision d'Endo III, et ce à l'intérieur d'un ADN de thymus de veau oxydé par des radiations ionisantes en milieu aéré (Wagner et al., 1996). Luo et al. a aussi montré que l'action du radical hydroxyle, issue d'une réaction de Fenton, pouvait donner la forme imidazolidine du dCyd (Luo et al., 1996) qui a aussi été observé dans une autre étude utilisant les radiations comme source de radical OH et l'utilisation d'un photosensibilisateur, ces processus donnaient respectivement de forts et faibles rendements de formation des imidazolidines dCyd (Decarroz et al., 1987). Il est intéressant de constater que les radiations ionisantes en

milieu aéré qui génèrent de façon majoritaire le 5-hydroxy-6-hydroperoxy-5,6-dihydro-dCyd, ont un rendement élevé dans la formation des imidazolidines dCyd (Decarroz , 1987), tandis que la photolyse qui est connue pour générer le 5-hydroperoxy-6-hydroxy-5,6-dihydro-dCyd mais aussi faiblement le dérivé 6-hydroperoxyde a un rendement faible dans leur formation, ce qui suggère un mécanisme de formation spécifique au dérivé 6-hydroperoxyde. Les dérivés cis des 1-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxo-imidazolidines

Formation des 1-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxo-imidazolidines

La formation des imidazolidines dCyd par l'action des radiations est issue de l'attaque en C5 du radical hydroxyle (90%) pour donner le 5-hydroxy-5,6-dihydro-2'-désoxycytidin-6-yl, qui en présence d'oxygène, va conduire au radical 5-hydroxy-5,6-dihydro-2'-désoxycytidin-6-yl. Cet intermédiaire hydroperoxyl va se réduire pour former le 5-hydroxy-6-hydroperoxy-5,6-dihydro-dCyd (voir la section I.3.1). L'utilisation d'un intermédiaire bromohydrine a pour avantage de former directement le dérivé 6-hydroperoxyde, sans former les intermédiaires radicalaires. La conversion des dérivés bromohydrines a aussi pour avantage d'étudier la stéréochimie et déterminer les mécanismes de formation des imidazolidines dCyd, car les deux bromohydrines trans se séparent par CHLP. De plus, elle ne nécessite pas de métaux de transitions, comme la réaction de Fenton, qui décomposeraient le dérivé 6-hydroperoxyde en diols, ce processus qui a déjà été observé pour les hydroperoxydes de Thd (Wagner et al., 1994) et ainsi intervenir sur le destin des hydroperoxydes de dCyd.

La conversion de la bromohydrine en hydroperoxyde par l'addition d'un nucléophile tel H_2O_2 ou H_2O a déjà été utilisée dans la formation des hydroperoxydes de Thd (dans le cas de H_2O_2) ainsi que pour les diols de dUrd et les diols de 5-MedCyd (dans

le cas de H₂O) (Bienvenu & Cadet, 1996; Decarroz , 1987; Wagner et al., 1994). Le mécanisme est le même qu'expliqué pour les diols de dCyd dans ce chapitre à l'exception de l'addition du H₂O₂ sur le C6 et résulte dans la formation majoritaire du composé cis 5-hydroxy-6-hydroperoxyde avec une inversion de configuration en C5 et une rétention de configuration en C6. L'hydroperoxyde va par la suite décomposer très rapidement pour donner les 1-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxo-imidazolidines (4 diastéréoisomères). Le mécanisme proposé est une cyclisation intramoléculaire entre l'hydroperoxyde en C6 et le C4 (IIa et IIb) (Bienvenu & Cadet, 1996; Wagner et al., 1999) (voir schéma 7). Dans cette étude nous avons montré que les isomères formés de façon majoritaire par la conversion en hydroperoxyde d'un mélange de bromohydrines sont les isomère cis, ce qui concorde avec les études sur la cytosine où les diastéréoisomères cis sont majoritaires (Hahn et al., 1973). La conversion de la bromohydrine purifiée 6S donne à >95% le *trans*-(4R,5R)-1-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxo-imidazolidine (12) tandis que la bromohydrine 6R donne le *trans*-(4S,5S)-1-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxo-imidazolidine (13). En raison de la renumérotation du nouveau composé où la base pyrimidique passe d'un cycle à 6 à un cycle à 5 dit imidazolidine, le C5 et C6 du bromohydrine deviennent respectivement le C4 et le C5 de ce cycle imidazolidine. La différence dans la formation majoritaire des diastéréoisomères cis obtenus à partir du mélange de bromohydrines versus les diastéréoisomères trans lorsque les bromohydrines sont purifiés est attribuée à un processus de tautomérisation impliquant le N1-C5, qui sera discuté plus en détail subséquemment, des isomères cis en trans (plus stable) qui est plus rapide à pH neutre dû à la purification CHLP comparé au pH acide du mélange de bromohydrine (pH 3-4 après la bromation du dCyd). Cette tautomérisation chaîne cycle entraîne une inversion de

configuration en C5 ce qui indique que les diastéréoisomères cis obtenus dans le mélange de bromohydrines ont subi une inversion de configuration en C4 et une rétention de configuration en C5. Cette stéréospécificité dans la formation des imidazolidines dCyd qui se traduit par une inversion de configuration en C4 et une rétention en C5, implique que le processus de recyclisation est concerté par l'attaque du N3 sur le C5 de la bromohydrine qui se fait en même temps que le départ du groupe partant soit le lien C4-C5, s'il y avait ouverture de cycle, un mélange de tout les imidazolidines dCyd serait observé. De plus, dû à un encombrement stérique créé par le pont de l'hydroperoxyde

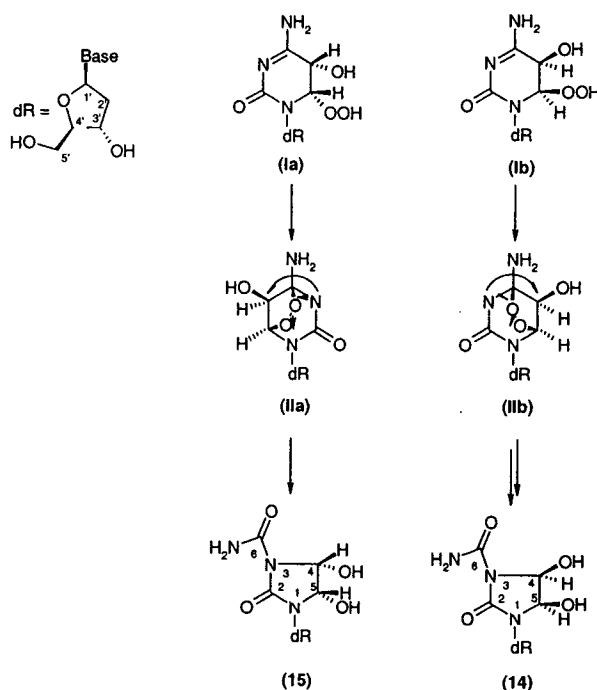


Schéma 7. Mécanisme de formation des 1-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxo-imidazolidines à partir des 6-hydroperoxydes de dCyd

entre C6 et C4, l'attaque par le N3 ne peut se faire que du côté opposé à celui-ci et explique cette inversion de configuration en C5. La synthèse des imidazolidines dCyd par la formation directe des hydroperoxydes sans passer par les intermédiaires radicalaires,

confirme que l'hydroperoxyde est bien impliqué dans le processus de cyclisation intramoléculaire

Décomposition des 1-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxo-imidazolidines dCyd

La décomposition des quatre diastéréoisomères à 37°C et pH 7.0 procède principalement par un processus de tautométrie entre le N1-C5, mais aussi entre le N3-C4, pour convertir dans le diastéréoisomère trans qui est beaucoup plus stable. Ces réactions d'isomérisations ont déjà été observées sur les diols de pyrimidines et sont attribuées à un processus de tautométrie chaîne-cyle et discuté précédemment dans la section formation des diols de dCyd. Les vitesses du processus de tautométrie pour tous les diastéréoisomères sont dépendants du pH et augmentent avec celui-ci. De plus, les sites de tautométrie varient aussi en fonction du pH pour tous les diastéréoisomères, à pH acide >90% est un processus de tautométrie qui se localise entre le N1-C5 et s'observe par la

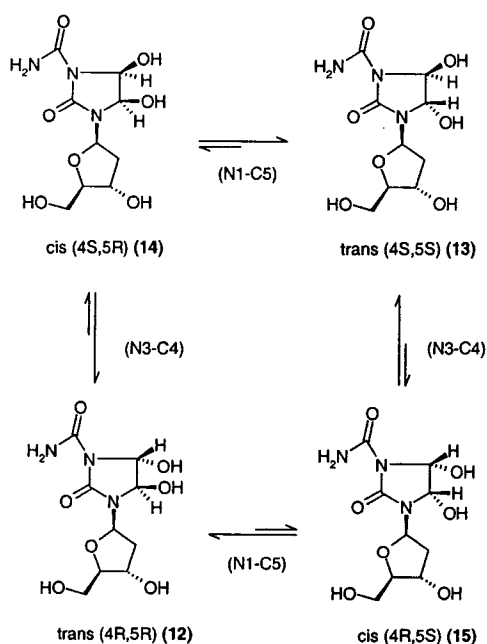


Schéma 8. Interconversion des 1-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxo-imidazolidines.

conversion du produit 15 en 12 et le produit 14 en 13 , tandis qu'à pH neutre un trans convertit en un autre traduisant un processus de tautomérie très rapide au site N1-C5 suivit d'une deuxième processus de tautomérie N3-C4. Finalement chaque isomères isolés (12-15) interconvertissent à pH basique dans un mélange composé des quatre diastéréoisomères, indiquant que l'épimérisation N3-C4 se produit à des vitesses voisines de celles en N1-C4 (voir schéma 8). La stabilité des quatre diastéréoisomères se traduit comme suit : trans(4S,5S) (13) > trans(4R,5R) (12) >> cis(4R,5S) (15) > cis(4S,5R) (14), les diastéréoisomères trans sont environ 100 fois plus stables que les cis et ce parce qu'ils sont thermodynamiquement plus stables (Leonard & Wiemer, 1976). Seul les diastéréoisomères trans ont pu être précédemment isolés pour des études de diffraction aux RX, et ce parce que les cis purifiés isomérisaient de façon spontanée en trans (Flippen, 1973; Hahn et al., 1973). Le processus d'e tautomérie entre le N1 et C5 observé est similaire à celui observé entre le N1-C6 des cycles pyrimidiques saturés (diols de Thd, diols de dCyd, diols de dUrd) qui passe par une forme carbonyle (voir schéma 5). L'effet de pH observé, laisse supposer que dans le cas des cycles imidazolidines, le proton du groupement hydroxyle en C5 est plus acide que celui en C4 et ainsi passerait plus facilement dans la forme cétonique à pH acide. Les diastéréoisomères trans des composés imidazolidines sont plus stables que les diastéréoisomères cis, ce qui est l'inverse des observations sur les diols des pyrimidines de cycle à 6 où les cis sont les plus stables. Il est probable que dans le cas des imidazolidines, les groupements hydroxyles sur la liaison 4-5 soient très près et causent un encombrement stérique qui défavoriserait les diastéréoisomères cis en faveur des trans.

Décomposition des 5-hydroxy-6-hydroperoxy-5,6-dihydro-dCyd

La décomposition des hydroperoxydes de dCyd en produits de réarrangement de cycle donnant les imidazolidines sans observer la formation des diols de dCyd soulève plusieurs interrogations. Comme il a été mentionné dans le premier chapitre, le produit majoritaire de l'oxydation du radical hydroxyle sur la dCyd se traduit à 90% par la formation du radical 5-hydroxy-5,6-dihydro-2'-désoxycytin-6-yl qui est converti par la suite dans le 5-hydroxy-6-hydroperoxy-5,6-dihydro-dCyd (voir schéma 1), toutefois les produits d'oxydations majoritaires de la dCyd observés dans l'ADN à la suite d'une oxydation par le radical hydroxyle sont : le oh^5dCyd , oh^5dUrd et les diols de dUrd, tous issus des diols de dCyd avec tout de même une bonne proportion des imidazolidines (Wagner et al., 1999). L'excision d'une faible quantité de ce composé cyclique imidazolidine à l'intérieur d'un ADN de thymus de veau irradié nous indique qu'il peut se former dans l'ADN double brin (Wagner et al., 1996) et exclu que l'encombrement avec l'entassement des bases n'inhibe, du moins complètement, sa formation malgré qu'il doive passer par un endoperoxyde intramoléculaire encombrant. Une hypothèse serait que les métaux de transitions liant l'ADN interviennent dans le destin des hydroperoxydes par leur réduction en faveur de la formation des diols de dCyd, ce qui a déjà été observé pour les hydroperoxydes de Thd (Wagner et al., 1994). Une autre hypothèse serait que les produits de cycle imidazolidine sont mal réparés par endo III, il faudrait donc introduire le dommage dans un oligonucléotide afin de tester sa réparation ainsi que sont potentiel mutagénique. La synthèse du bromohydrine dCyd ouvre aussi la voie à la formation des produits de décomposition des 5-hydroperoxy-6-hydroxy-5,6-dihydro-2'-désoxycytidine

en utilisant une irradiation sélective avec des UV. Toute une chimie excitante entoure ces hydroperoxydes, étant les produits primaires formés après une attaque par le radical hydroxyle, les différents mécanismes de décomposition de ceux-ci qui conduiront à différentes bases modifiées vont régir les effets biologiques sur la cellule et déclencher des mécanismes de réparation où d'apoptose, tout dépendent de la toxicité du dommage formé.

Chapitre VI – Perspectives et conclusion

En perspective, la grande labilité des diols de dCyd et le manque de spécificité, oxydant à générer uniquement des diols de dCyd, obligent l'élaboration d'une voie de synthèse chimique des diols de dCyd. L'utilisation de groupements protecteurs spécifiques aux diols permettraient de stabiliser les diols sous forme de nucléoside phosphoramidite et permettraient de les incorporer par une synthèse chimique d'oligonucléotide. De plus, l'utilisation du groupement protecteur photolabile tel une forme aldéhyde du coumarin, permettrait une déprotection simple par l'utilisation de la lumière après hybridation et ainsi de piéger le diol de dCyd dans sa forme double brin (Lin & Lawrence, 2002). Cette synthèse chimique du diol dans un oligonucléotide aurait l'avantage de former spécifiquement ce dommage dans la séquence désirée, dans un site spécifique et même de l'incorporer dans un organisme vivant pour permettre les études de réparation et de mutagenèse *in vitro* ainsi que *in vivo*. De plus, cette voie de synthèse qui paraît prometteuse, pourrait être aussi adaptée aux 1-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxo-imidazolidines. Les différentes études effectuées dans cette thèse ont permis de démontrer le rôle potentiel des diols de dCyd dans la mutagenèse causée par le stress oxydatif. Il est clair que pour apporter toute la lumière sur l'implication des diols de dCyd dans cette mutagenèse, une stratégie tel que décrite précédemment devra être mise au point pour contourner les limitations de séquence et de stabilité rencontrées dans le modèle utilisé.

En conclusion, les effets du stress oxydatif causés par les ERO et RNS ont un impact important sur la cellule, ils peuvent avoir des rôles bénéfiques tels un gain supérieur en énergie pour chaque molécule de glucose consommée, dans la formation d'hormones stéroïdiennes, en servant de messagers cellulaires ou de protéger l'organisme contre des corps étrangers pathogènes. Mais ces ERO et RNS ont aussi des effets délétères pouvant entraîner différents désordres physiologiques tels la formation de cancers, des maladies neurodégénératives ainsi qu'une implication dans le vieillissement. C'est cette dualité entre bienfaits et toxicité qui nous oblige à mieux comprendre la formation de ERO et RNS afin de développer des moyens de contrôler ces niveaux, entre autres par l'apport d'antioxydants dans la diète tels la vitamine C ou la vitamine E, ce de façon à limiter les dommages causés aux différentes composantes cellulaires et prévenir certaines pathologies. Toutefois pour effectuer les relations entre causes à effets dans de tels projets, il faut avoir des marqueurs biologiques fiables avec un lien direct et qui permettent de voir les effets dans un délai de temps raisonnable. La compréhension des dommages causés sur l'ADN par les ERO et RNS est un secteur de recherche passionnant autant par la diversité des effets biologiques causés que par les multitudes de modifications engendrées par le stress oxydatif. De plus, le potentiel mutagène des modifications engendrées sur la dCyd soit par sa désaminations ou par mésappariement de bases font que celles-ci peuvent être directement impliquées dans la cancérogenèse ce qui pourrait en faire des excellents marqueurs.

Remerciements

Je tiens à remercier le Dr Wagner de m'avoir accepté dans son laboratoire et fait confiance dans la réalisation de ces projets. Je le remercie aussi pour ses conseils autant au niveau technique que dans la rédaction des articles et finalement dans la correction de ma thèse.

Je souhaite remercier mes collègues de travail, Kevin Lenton, Guillaume Râtelle, Hélène Thériault, Johann Rivière, François Bergeron et Sylvain Cecchini pour les discussions intéressantes sur les différents aspects et rôles des radicaux libres dans les cellules vivantes. Je tiens à remercier plus spécialement Johann, François et Sylvain pour l'aide apportée au niveau technique.

Je désire tout particulièrement remercier mes parents qui m'ont supporté de façon inconditionnelle tout au long de mon cheminement académique. Je les remercie pour l'intérêt et l'importance qu'ils ont accordés à mon domaine d'étude. Sans cet intérêt ainsi que leur support moral et financier, ce travail n'aurait pas été possible.

Ma plus grande gratitude va à mon épouse Catherine pour son support, ses encouragements ainsi que pour sa patience et les sacrifices qu'elle a dû faire pour que je termine mes études. À mes enfants, Marius, Jérôme et Ludovic, qui sont mes rayons soleils de tous les jours et m'aident à voir le monde qui m'entoure sous un œil différent.

Finalement, je remercie tous les gens du département qui par leur agréable présence, ont fait que ces journées passées soient des plus conviviales.

Références

- Adelman, R., Saul, R.L., & Ames, B.N. (1988) Oxidative damage to DNA: relation to species metabolic rate and life span. *Proc Natl Acad Sci* 85, 2706-2708.
- Alberts, B., Lewis, J., Roberts, K., Dennis, B., Raff, M., and Watson, D. J.(1994) in *Molecular biology of the cell* Garland Publishing, New York & London.
- Ames, B.N., Cathcart, R., Schwiers, E., & Hochstein, P. (1981) Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci* 78, 6858-6862.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., & Hagen, T.M. (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci* 90, 7915-7922.
- Andrews, N.C. (1999) Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med* 341, 1986-1995.
- Bailly, V. & Verly, W.G. (1987) Escherichia coli endonuclease III is not an endonuclease but a beta-elimination catalyst. *Biochem J* 242, 565-572.
- Barak, Y., Cohen-Fix, O., & Livneh, Z. (1995) Deamination of Cytosine-containing pyrimidine photodimers in UV-irradiated DNA. *J Biol Chem* 270, 24174-24179.
- Barja, G. & Herrero, A. (2000) Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB J* 14, 312-318.
- Becker, H., LeBlanc, J.C., & Johns, H.E. (1967) The U.V. photochemistry of cytidylic acid. *Photochem Photobiol* 6, 733-743.
- Beckman, K.B. & Ames, B.N. (1998) The free radical theory of aging matures. [Review] [357 refs]. *Physiological Reviews* 78, 547-581.
- Berliner, L.J., Khramtsov, V., Fujii, H., & Clanton, T.L. (2001) Unique in vivo applications of

- spin traps. *Free Radic Biol Med* 30 , 489-499.
- Bhagwat, A.S. (2004) DNA-cytosine deaminases: from antibody maturation to antiviral defense. *DNA Repair (Amst)* 3, 85-89.
- Bhattacharyya, S.N. & Mandal, P.C. (1983) Effect of iron (III) ions on the radiosensitivity of uracil. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 43, 141-148.
- Bienvenu, C. (1996) Oxydation radicalaire de la 5-Méthyl-2'-désoxycytidine. *Thèse*, 206 p, Université de Grenoble.
- Bienvenu, C. & Cadet, J. (1996) Synthesis and kinetic study of the deamination of the cis diastereomers of 5,6-dihydroxy-5,6-dihydro-5-methyl-2'-deoxycytidine. *J Org Chem* 61, 2632-2637.
- Bienvenu, C., Wagner, J.R., & Cadet, J. (1996) Photosensitized oxidation of 5-methyl-2'-deoxycytidine by 2-methyl-1,4-naphthoquinone - characterization of 5-(hydroperoxymethyl)-2'-deoxycytidine and stable methyl group oxidation products. *J Am Chem Soc* 118, 11406-11411.
- Bjelland, S. & Seeberg, E. (2003) Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat Res* 531, 37-80.
- Bohr, V.A. (2002) Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radic Biol Med* 32, 804-812.
- Boorstein, R.J., Hilbert, T.P., Cunningham, R.P. , & Teebor, G.W. (1990) Formation and stability of repairable pyrimidine photohydrates in DNA. *Biochemistry* 29, 10455-10460.
- Bourdat, A.G., Douki, T., Frelon, S., Gasparutto, D., & Cadet, J. (2000) Tandem base lesions are generated by hydroxyl radical within isolated DNA in aerated aqueous solution. *J Am Chem Soc* 122, 4549-4556.
- Boveris, A. & Chance, B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General

- properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134, 707-716.
- Breen, P.A. & Murphy, A.J. (1995) Reaction of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med* 18, 1033-1077.
- Bui, C.T. & Cotton, R.G. (2002) Comparative study of permanganate oxidation reactions of nucleotide bases by spectroscopy. *Bioorg Chem* 30, 133-137.
- Burdzy, A., Noyes, K.T., Valinluck, V., & Sowers, L.C. (2002) Synthesis of stable-isotope enriched 5-methylpyrimidines and their use as probes of base reactivity in DNA. *Nucleic Acids Res* 30, 4068-4074.
- Burrows, C.J. & Muller, J.G. (1998) Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission. *Chem Rev* 98, 1109-1152.
- Burton, K. & Riley, W.T. (1966) Selective degradation of thymidine and thymine deoxynucleotides. *Biochem J* 98, 70-77.
- Cadet, J. résultats non publiés.
- Cadet, J., Berger, M., Decarroz, C., Wagner, J.R., van Lier, J.E., Ginot, Y.M., & Vigny, P. (1986) Photosensitized reactions of nucleic acids. *Biochimie* 68, 813-834.
- Cadet, J., Berger, M., Douki, T., & Ravanat, J.L. (1997) Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 131, 1-87.
- Cadet, J., Bourdat, A.G., D'Ham, C., Duarte, V., Gasparutto, D., Romieu, A., & Ravanat, J.L. (2000) Oxidative base damage to DNA: specificity of base excision repair enzymes. *Mutat Res* 462, 121-128.
- Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J.P., Ravanat, J.L., & Sauvaigo, S. (1999) Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutation Research - Fundamental & Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 424, 9-21.

- Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D., & Ravanat, J.L. (2003) Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res* 531, 5-23.
- Cadet, J., Douki, T., Pouget, J.P., Ravanat, J.L., & Sauvaigo, S. (2001) Effects of UV and visible radiations on cellular DNA. *Curr Probl Dermatol* 29, 62-73.
- Cadet, J., Douki, T., & Ravanat, J.L. (1997) Artifacts associated with the measurement of oxidized DNA bases. [Review] [83 refs]. *Environ Health Perspect* 105, 1034-1039.
- Cadet, J., Douki, T., & Ravanat, J.L. (1998) Facts and Artifacts in the Measurement of Oxidative Base Damage to DNA. *Free Radic Res* 29, 541-550.
- Cadet, J., Ducoulomb, R., & Hruska, F.E. (1979) Proton magnetic resonance studies of 5,6-saturated thymidine derivatives produced by ionizing radiation. Conformational analysis of 6-hydroxylated diastereoisomers. *Biochim Biophys Acta* 563, 206-215.
- Cadet, J., Teoule, R., & Ulrich, J. (1975) Isomerisation and new specific synthesis of thymine glycol. *Tetrahedron* 31, 2057-2061.
- Cadet, J. & Téoule, R. (1978) Comparative study of oxidation of nucleic acid components by hydroxyl radicals, singlet oxygen and superoxide anion radicals. *Photochem Photobiol* 28, 661-667.
- Carell, T., Burgdorf, L.T., Kundu, L.M., & Cichon, M. (2001) The mechanism of action of DNA photolyases. *Curr Opin Chem Biol* 5, 491-498.
- Cathcart, R., Schwiers, E., Saul, R.L., & Ames, B.N. (1984) Thymine glycol and thymidine glycol in human and rat urine: a possible assay for oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci* 81, 5633-5637.
- Chabita, K., Saha, A., Mandal, P.C., Bhattacharyya, S.N., Rath, M.C., & Mukherjee, T. (1996) Reactions of OH and eaq⁻ adducts of cytosine and its nucleosides or nucleotides with Cu(II) ions in dilute aqueous solutions: a steady-state and pulse radiolysis study. *Radiat Res* 146, 514-524.

- Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59, 527-605.
- Coleman, J.E., Ricciuti, C., & Swern, D. (1956) Improved Preparation of 9(10),10(9)-Ketohydroxystearic Acids by Oxidation of Oleic Acid with Potassium Permanganate in Neutral Solution. *J Am Chem Soc* 78, 5342-5345.
- Coulondre, C., Miller, J.H., Farabaugh, P.J., & Gilbert, W. (1978) Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature* 274, 775-780.
- Cutler, R.G. (1985) Antioxidants and longevity of mammalian species. *Basic Life Sci* 35, 15-73.
- Czapski, G. & Ilan, Y.A. (1978) On the generation of the hydroxylation agent from superoxide radical. Can the Haber-Weiss reaction be the source of OH radicals? *Photochem Photobiol* 28, 651-653.
- D'Ham, C., Romieu, A., Jaquinod, M., Gasparutto, D., & Cadet, J. (1999) Excision of 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymine, 5,6-dihydrothymine, and 5-hydroxycytosine from defined sequence oligonucleotides by *Escherichia coli* endonuclease III and Fpg proteins: Kinetic and mechanistic aspects. *Biochemistry* 38, 3335-5344.
- Datta, R., Cole, A., & Robinson, S. (1976) Use of track-end alpha particles from ²⁴¹Am to study radiosensitive sites in CHO cells. *Radiat Res* 65, 139-151.
- de Boer, J. & Hoeijmakers, J.H. (2000) Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 21, 453-460.
- DeBoer, G., Klinghoffer, O., & Johns, H.E. (1970) Reversal mechanisms for the photohydrates of cytosine and its derivatives. *Biochim Biophys Acta* 213, 253-268.
- Decarroz, C. (1987) Oxydation radicalaire de l'ADN. *Thèse*, Université de Grenoble.
- Decarroz, C., Wagner, J.R., & Cadet, J. (1987) Specific deprotonation reactions of the pyrimidine radical cation resulting from the menadione mediated photosensitization of 2'-

deoxycytidine. *Free Radic Res Commun* 2, 295-301.

Decarroz, C., Wagner, J.R., van Lier, J.E., Krishna, C.M., Riesz, P., & Cadet, J. (1986) Sensitized photo-oxidation of thymidine by 2-methyl-1,4-naphthoquinone. Characterization of the stable photoproducts. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 50, 491-505.

Deeble, D.J., Schulz, D., & von Sonntag, C. (1986) Reactions of OH radicals with poly(U) in deoxygenated solutions: sites of OH radical attack and the kinetics of base release. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 49, 915-926.

Dianov, G.L., Thybo, T., Dianova, I.I., Lipinski, L.J., & Bohr, V.A. (2000) Single nucleotide patch base excision repair is the major pathway for removal of thymine glycol from DNA in human cell extracts. *J Biol Chem* 275, 11809-11813.

Dizdaroglu, M. (1998) Facts about the artifacts in the measurement of oxidative DNA base damage by gas chromatography mass spectrometry. *Free Radic Res* 29, 551-563.

Dizdaroglu, M., Holwitt, E., Hagan, M.P., & Blakely, W.F. (1986) Formation of cytosine glycol and 5,6-dihydroxycytosine in deoxyribonucleic acid on treatment with osmium tetroxide. *Biochem J* 235, 531-536.

Dizdaroglu, M., Karahalil, B., Senturker, S., Buckley, T.J., & Roldan-Arjona, T. (1999) Excision of products of oxidative DNA base damage by human NTH1 protein. *Biochemistry* 38, 243-246.

Douki, T., Delatour, T., Bianchini, F., & Cadet, J. (1996a) Observation and prevention of an artefactual formation of oxidized DNA bases and nucleosides in the GC-EIMS method. *Carcinogenesis* 17, 347-353.

Douki, T., Delatour, T., Paganon, F., & Cadet, J. (1996b) Measurement of oxidative damage at pyrimidine bases in gamma-irradiated DNA. *Chem Res Toxicol* 9, 1145-1151.

Ducolomb, R., Cadet, J., Taieb, C., & Teoule, R. (1976) Isomerisation and conformation studies of (+)- and (-)-6-hydroxy-5, 6-dihydrouridine. *Biochim Biophys Acta* 432, 18-27.

- Ehrlich, M., Norris, K.F., Wang, R.Y., Kuo, K.C., & Gehrke, C.W. (1986) DNA cytosine methylation and heat-induced deamination. *Biosci Rep* 6, 387-393.
- Essers, J., van Steeg, H., de Wit, J., Swagemakers, S.M., Vermeij, M., Hoeijmakers, J.H., & Kanaar, R. (2000) Homologous and non-homologous recombination differentially affect DNA damage repair in mice. *EMBO J* 19, 1703-1710.
- Fang, Y.Z., Yang, S., & Wu, G. (2002) Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18, 872-879.
- Fazakerly, G.V., Gdaniec Z., & Sowers, L.C. (1993) Base-pair shifts in tautomeric equilibrium of a modified DNA base. *J Mol Biol* 6-10.
- Feig, D.I., Sowers, L.C., & Loeb, L.A. (1994) Reverse chemical mutagenesis: identification of the mutagenic lesions resulting from reactive oxygen species-mediated damage to DNA. *Proc Natl Acad Sci* 91, 6609-6613.
- Ferradini, C. & Pucheault, J. (1983) in *Radiolysé de l'eau et des solutions aqueuses*, 24-81, Masson, Paris, France.
- Flippen, J.L. (1973) The crystal and molecular structures of reaction product from γ -irradiation of thymine and cytosine: *cis*-thymine glycol, $C_5H_3N_2O_4$, and *trans*-1-carbamoyl-imidazolidone-4,5-diol, $C_4H_7N_3O_4$. *Acta Crystallographica B* 29, 1756-1762.
- Foote, C.S. (1991) Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol* 54, 659.
- Fortini, P., Parlanti, E., Sidorkina, O.M., Laval, J., & Dogliotti, E. (1999) The type of DNA glycosylase determines the base excision repair pathway in mammalian cells. *J Biol Chem* 274, 15230-15236.
- Frederico, A.L., Kunkel, A.T., & Shaw, R.B. (1990) A sensitive genetic assay for detection of cytosine deamination: determination of rate constant and activation energy. *Biochemistry* 29, 2532-2537.

- Friedberg, C. E, Walker, C. G, and Wolfram, S.(1995) in *DNA Repair and Mutagenesis* Friedberg C. E, Walker C. G, and Wolfram SASM Press, Washington, USA.
- Fritzsche, E., Hayatsu, H., Igloi, G.L., Iida, S., & Kossel, H. (1987) The use of permanganate as a sequencing reagent for identification of 5-methylcytosine residues in DNA. *Nucleic Acids Res* 15, 5517-5528.
- Frosina, G., Fortini, P., Rossi, O., Carrozzino, F., Raspaglio, G., Cox, L.S., Lane, D.P., Abbondandolo, A., & Dogliotti, E. (1996) Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem* 271, 9573-9578.
- Fujimoto, J., Tran, L., & Sowers, L.C. (1997) Synthesis and cleavage of oligodeoxynucleotides containing a 5-Hydroxyuracil residue at defined site. *Chem Res Toxicol* 10, 1254-1258.
- Gabbara, S. & Bhagwat, A.S. (1995) The mechanism of inhibition of DNA (cytosine-5)-methyltransferases by 5-azacytosine is likely to involve methyl transfer to the inhibitor. *Biochem J* 307 (Pt 1), 87-92.
- Gan, J., Zhang, Y.L., Carter, K.B., Cauthron, R.D., & Steinberg, R.A. (1999) On the spontaneous mutability of CpG sites in cultured S49 mouse lymphoma cells. *Somat* 25, 129-145.
- Ganguly, T., Weems, K.M., & Duker, N.J. (1990) Ultraviolet-induced thymine hydrates in DNA are excised by bacterial and human DNA glycosylase activities. *Biochemistry* 29 , 7222-7228.
- Grishko, V.I., Driggers, W.J., LeDoux, S.P., & Wilson, G.L. (1997) Repair of oxidative damage in nuclear DNA sequences with different transcriptional activities [published erratum appears in *Mutat Res* 1998 Feb;407(1):85]. *Mutat Res* 384, 73-80.
- Hahn, B.S., Wang, S.Y., Flippen, J.L., & Karle, I.L. (1973) Radiation chemistry of nucleic acids. Isolation and characterization of glycols of 1-carbamylimidazolidone as products of cytosine. *J Am Chem Soc* 95, 2711-2712.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C.(1999) in *Free Rad Biol Med* Halliwell, B. and Gutteridge,

J.M.C.Oxford University Press , Oxford, UK.

- Hamilton, M.L., Van Remmen, H., Drake, J.A., Yang, H., Guo, Z.M., Kewitt, K., Walter, C.A., & Richardson, A. (2001) Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc Natl Acad Sci* 98, 10469-10474.
- Hansler, U. & Rokita, S.E. (1993) Electrostatics rather than conformation control the oxidation of DNA by the anionic reagent permanganate. *J Am Chem Soc* 115, 8554-8557.
- Harris, R.S., Petersen-Mahrt, S.K., & Neuberger, M.S. (2002) RNA editing enzyme APOBEC1 and some of its homologs can act as DNA mutators. *Mol Cell* 10, 1247-1253.
- Hatahet, Z., Kow, Y.W., Purmal, A.A., Cunningham, R.P., & Wallace, S.S. (1994) New substrates for old enzymes. 5-Hydroxy-2'-deoxycytidine and 5-hydroxy-2'-deoxyuridine are substrates for Escherichia coli endonuclease III and formamidopyrimidine DNA N-glycosylase, while 5-hydroxy-2'-deoxyuridine is a substrate for uracil DNA N-glycosylase. *J. Biol Chem* 269, 18814-18820.
- Hayatsu, H. (1996) The 5,6-double bond of pyrimidine nucleosides, a fragile site in nucleic acids. *J Biochem (Tokyo)* 119, 391-395.
- Hayatsu, H., Atsumi, G., Nawamura, T., Kanamitsu, S., Negishi, K., & Maeda, M. (1991) Permanganate oxidation of nucleic acid components: a reinvestigation. *Nucleic Acids Symp Ser* 77-78.
- Hayatsu, H. & Iida, S. (1969) Studies on the chemical modifications of nucleic acids. The permanganate oxidation of thymine. *Tetrahedron Lett* 13, 1031-1034.
- Hayes, R.C., Petruccio, L.A., Huang, H.M., Wallace, S.S., & LeClerc, J.E. (1988) Oxidative damage in DNA. Lack of mutagenicity by thymine glycol lesions. *J Mol Biol* 201, 239-246.
- Hazra, D.K. & Steenken, S. (1983) Pattern of OH radical addition to cytosine and 1-, 3-, 5- and 6-Substituted Cytosines. Electron transfer and dehydration reactions of OH adducts. *J Am*

Chem Soc 105, 4380-4386.

- Helbock, H.J., Beckman, K.B., Shigenaga, M.K., Walter, P.B., Woodall, A.A., Yeo, H.C., & Ames, B.N. (1998) DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc Natl Acad Sci* 95, 288-293.
- Henle, E.S. & Linn, S. (1997) Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. [Review] [82 refs]. *J Biol Chem* 272, 19095-19098.
- Hussain, S.P., Aguilar, F., Amstad, P., & Cerutti, P. (1994) Oxy-radical induced mutagenesis of hotspot codons 248 and 249 of the human p53 gene. *Oncogene* 9, 2277-2781.
- Ide, H. & Kotera, M. (2004) Human DNA glycosylases involved in the repair of oxidatively damaged DNA. *Biol Pharm Bull* 27, 480-485.
- Ide, H., Kow, Y.W., & Wallace, S.S. (1985) Thymine glycols and urea residues in M13 DNA constitute replicative blocks in vitro. *Nucleic Acids Res* 13, 8035-8052.
- Iida, S. & Hayatsu, H. (1970) The permanganate oxidation of thymine. *Biochim Biophys Acta* 213, 1-13.
- Iida, S. & Hayatsu, H. (1971a) The permanganate oxidation of deoxyribonucleic acid. *Biochim Biophys Acta* 240, 370-375.
- Iida, S. & Hayatsu, H. (1971b) The permanganate oxidation of thymidine and thymidylic acid. *Biochim Biophys Acta* 228, 1-8.
- Iida, S., Wataya, Y., Kudo, I., Kai, K., & Hayatsu, H. (1974) Bisulfite-catalyzed tritium labeling of DNA and RNA. *FEBS Lett* 39, 263-266.
- Imlay, J.A. & Fridovich, I. (1991) Assay of metabolic superoxide production in Escherichia coli. *J Biol Chem* 266, 6957-6965.
- Inoue H, Koizume S, Yamauchi T, Murata K, & Ohtsuka E (1997) Novel dna damage mediated by oxidation of various modified nucleotide residues. *Nucleosides Nucleotides* 16, 1489-

- Ito, S., Kinoshita, T., & Sasaki, K. (1984) Oxidative degradation of thymine with O₂ promoted by L-ascorbic acid and Cu(II) ion. *Nucleic Acids Symp Ser* 5-8.
- Izumi, T., Wiederhold, L.R., Roy, G., Roy, R., Jaiswal, A., Bhakat, K.K., Mitra, S., & Hazra, T.K. (2003) Mammalian DNA base excision repair proteins: their interactions and role in repair of oxidative DNA damage. *Toxicology* 193, 43-65.
- Izzotti, A., Cartiglia, C., Taningher, M., De Flora, S., & Balansky, R. (1999) Age-related increases of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and DNA-protein crosslinks in mouse organs. *Mutat Res* 446, 215-223.
- Jiang, J.J., Liu, K.J., Jordan, S.J., Swartz, H.M., & Mason, R.P. (1996) Detection of free radical metabolite formation using in vivo EPR spectroscopy: evidence of rat hemoglobin thiyl radical formation following administration of phenylhydrazine. *Arch Biochem Biophys* 330, 266-270.
- Johns, H.E., LeBlanc, J.C., & Freeman, K.B. (1965) Reversal and deamination rates of the main ultraviolet photoproduct of cytidilic acid. *J Mol Biol* 13, 849-861.
- Jolibois, F., Voituriez, L., Grand, A., & Cadet, J. (1996) Conformational and electronic properties of the two cis (5S,6R) and (5R,6S) diastereoisomers of 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymidine: X-ray and theoretical studies. *Chem Res Toxicol* 9, 298-305.
- Jones, P.A., Rideout, W.M. 3rd, Shen, J.C., Spruck, C.H., & Tsai, Y.C. (1992) Methylation, mutation and cancer. *BioEssays* 14, 33-36.
- Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberger, N., Strouboulis, J., & Wolffe, A.P. (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 19, 187-191.
- Jost, J.P. & Hofsteenge, J. (1992) The repressor MDBP-2 is a member of the histone H1 family that binds preferentially in vitro and in vivo to methylated nonspecific DNA sequences.

Proc Natl Acad Sci 89, 9499-9503.

Karahalil, B., Roldan-Arjona, T., & Dizdaroglu, M. (1998) Substrate specificity of Schizosaccharomyces pombe Nth protein for products of oxidative DNA damage. *Biochemistry* 37, 590-595.

Kass, S.U., Pruss, D., & Wolffe, A.P. (1997) How does DNA methylation repress transcription? *Trends Genet* 13, 444-449.

Khan, N. & Swartz, H. (2002) Measurements in vivo of parameters pertinent to ROS/RNS using EPR spectroscopy. *Mol Cell Biochem* 234-235, 341-57.

Klein, J.C., Bleeker, M.J., Saris, C.P., Roelen, H.C., Brugghe, H.F., van den Elst, H., van der Marel, G.A., van Boom, J.H., Westra, J.G., Kriek, E., & et, a.l. (1992) Repair and replication of plasmids with site-specific 8-oxodG and 8-AAFdG residues in normal and repair-deficient human cells. *Nucleic Acids Res* 20, 4437-4443.

Klungland, A., Rosewell, I., Hollenbach, S., Larsen, E., Daly, G., Epe, B., Seeberg, E., Lindahl, T., & Barnes, D.E. (1999) Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc Natl Acad Sci* 96, 13300-13305.

Kow, Y.W. & Wallace, S.S. (1987) Mechanism of action of Escherichia coli endonuclease III. *Biochemistry* 26, 8200-8206.

Kreutzer, D.A. & Essigmann, J.M. (1998) Oxidized, deaminated cytosines are a source of C --> T transitions in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 95, 3578-3582.

Ku, H.H., Brunk, U.T., & Sohal, R.S. (1993) Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Radic Biol Med* 15, 621-627.

Kunkel, T.A., Schaaper, R.M., & Loeb, L.A. (1983) Depurination-induced infidelity of deoxyribonucleic acid synthesis with purified deoxyribonucleic acid replication proteins in vitro. *Biochemistry* 22, 2378-2384.

- Lambrinakos, A., Humphrey, K.E., Babon, J.J., Ellis, T.P., & Cotton, R.G. (1999) Reactivity of potassium permanganate and tetraethylammonium chloride with mismatched bases and a simple mutation detection protocol. *Nucleic Acids Res* 27, 1866-1874.
- Lawrence, C.W., Borden, A., Banerjee, S.K., & LeClerc, J.E. (1990) Mutation frequency and spectrum resulting from a single abasic site in a single-stranded vector. *Nucleic Acids Res* 18, 2153-2127.
- Leadon, S.A. & Cooper, P.K. (1993) Preferential repair of ionizing radiation-induced damage in the transcribed strand of an active human gene is defective in Cockayne syndrome. *Proc Natl Acad Sci* 90, 10499-10503.
- Leadon, S.A. & Lawrence, D.A. (1991) Preferential repair of DNA damage on the transcribed strand of the human metallothionein genes requires RNA polymerase II. *Mutat Res* 255, 67-78.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.N., & Cox, M.M. (1993) Principles of Biochemistry. 1013 p.
- Lenaz, G. (1998) Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Biochim Biophys Acta* 1366, 53-67.
- Lenton, K.J., Therriault, H., Fulop, T., Payette, H., & Wagner, J.R. (1999) Glutathione and ascorbate are negatively correlated with oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Carcinogenesis* 20, 607-613.
- Leonard, N.J. & Wiemer, D.F. (1976) Synthesis of Cytosine Radiolysis Products: cis and trans-1-Carbamoyl-4,5-dihydroxyimidazolidin-2-one. *J Am Chem Soc* 98, 8218-8221.
- Lin, W. & Lawrence, D.S. (2002) A strategy for the construction of caged diols using a photolabile protecting group. *J Org Chem* 67, 2723-2726.
- Lindahl, T. (1979) DNA glycosylases, endonucleases for apurinic/apyrimidinic sites, and base excision-repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 22, 135-192.

- Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709-715.
- Lindahl, T. & Anderson, A. (1972) Rate of chain breakage at apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 11, 3618-3623.
- Lindahl, T. & Karlstrom, O. (1973) Heat-induced depyrimidination of deoxyribonucleic acid in neutral solution. *Biochemistry* 12, 5151-5154.
- Lindahl, T. & Nyberg, B. (1972) Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 11, 3610-3618.
- Lindahl, T. & Nyberg, B. (1974) Heat-induced Deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 13, 3405-3410.
- Loeb, K.R. & Loeb, L.A. (2000) Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis* 21, 379-385.
- Lopez-Torres, M., Gredilla, R., Sanz, A., & Barja, G. (2002) Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria. *Free Radic Biol Med* 32, 882-889.
- Loprete, D.M. & Hartman, K.A. (1993) Conditions for the stability of the B, C, and Z structural forms of poly(dG-dC) in the presence of lithium, potassium, magnesium, calcium, and zinc cations. *Biochemistry* 32, 4077-4082.
- Luo, Y., Henle, E.S., & Linn, S. (1996) Oxidative damage to DNA constituents by iron-mediated fenton reactions. The deoxycytidine family. *J Biol Chem* 271, 21167-21176.
- Lustig, M.J., Cadet, J., Boorstein, R.J., & Teebor, G.W. (1992) Synthesis of the diastereomers of thymidine glycol, determination of concentrations and rates of interconversion of their cis-trans epimers at equilibrium and demonstration of differential alkali lability within DNA. *Nucleic Acids Res* 20, 4839-4845.
- Lutsenko, E. & Bhagwat, A.S. (1999) Principal causes of hot spots for cytosine to thymine

- mutations at sites of cytosine methylation in growing cells. A model, its experimental support and implications. *Mutat Res* 437, 11-20.
- Macintyre, G., Atwood, C.V., & Cupples, C.G. (2001) Lowering S-adenosylmethionine levels in *Escherichia coli* modulates C-to-T transition mutations. *J Bacteriol* 183, 921-927.
- McGowan, C.H. (2003) Running into problems: how cells cope with replicating damaged DNA. *Mutat Res* 532, 75-84.
- Millar, C.B., Guy, J., Sansom, O.J., Selfridge, J., MacDougall, E., Hendrich, B., Keightley, P.D., Bishop, S.M., Clarke, A.R., & Bird, A. (2002) Enhanced CpG mutability and tumorigenesis in MBD4-deficient mice. *Science* 297, 403-405.
- Miskovsky, P., Tomkova, A., Chinsky, L., & Turpin, P.Y. (1993) Conformational transitions of poly(dI-dC) in aqueous solution as studied by ultraviolet resonance Raman spectroscopy. *J Biomol Struct Dyn* 11, 655-669.
- Mitchell, D.L., Jen, J., & Cleaver, J.E. (1991) Relative induction of cyclobutane dimers and cytosine photohydrates in DNA irradiated in vitro and in vivo with ultraviolet-C and ultraviolet-B light. *Photochem Photobiol* 54, 741-746.
- Moore, A.M. & Thomson, C.H. (1955) Ultraviolet irradiation of pyrimidine derivatives. *Science* 122, 594-595.
- Munro, T.R. (1970a) The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of Chinese hamster fibroblasts. *Radiat Res* 42, 451-470.
- Munro, T.R. (1970b) The site of the target region for radiation-induced mitotic delay in cultured mammalian cells. *Radiat Res* 44, 747-57.
- Najrana, T., Saito, Y., Uraki, F., Kubo, K., & Yamamoto, K. (2000) Spontaneous and osmium tetroxide-induced mutagenesis in an *Escherichia coli* strain deficient in both endonuclease III and endonuclease VIII. *Mutagenesis* 15, 121-125.

- Nawamura, T., Negishi, K., & Hayatsu, H. (1994) 8-Hydroxyguanine is not produced by permanganate oxidation of DNA. *Arch Biochem Biophys* 311, 523-524.
- Neuberger, M.S., Harris, R.S., Di Noia, J., & Petersen-Mahrt, S.K. (2003) Immunity through DNA deamination. *Trends Biochem Sci* 28, 305-312.
- Nohl, H. & Hegner, D. (1978) Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo? *Eur J Biochem* 82, 563-567.
- Novakov, C.P., Feerman, D., Cederbaum, A.I., & Stoyanovsky, D.A. (2001) An ESR and HPLC-EC assay for the detection of alkyl radicals. *Chem Res Toxicol* 14, 1239-1246.
- O'Donnell, R.E., Boorstein, R.J., Cunningham, R.P., & Teebor, G.W. (1994) Effect of pH and temperature on the stability of UV-induced repairable pyrimidine hydrates in DNA. *Biochemistry* 33, 9875-9880.
- Pfeifer, G.P. (2000) p53 mutational spectra and the role of methylated CpG sequences. *Mutat Res* 450, 155-166.
- Pohl, F.M. & Jovin, T.M. (1972) Salt-induced co-operative conformational change of a synthetic DNA: equilibrium and kinetic studies with poly (dG-dC). *J Mol Biol* 67, 375-396.
- Purmal, A.A., Kow, Y.W., & Wallace, S.S. (1994) Major oxidative products of cytosine, 5-hydroxycytosine and 5-hydroxyuracil, exhibit sequence context-dependent mispairing in vitro. *Nucleic Acids Res* 22, 72-78.
- Purmal, A.A., Lampman, G.W., Bond, J.P., Hatahet, Z., & Wallace, S.S. (1998) Enzymatic processing of uracil glycol, a major oxidative product of DNA cytosine. *J Biol Chem* 273, 10026-10035.
- Ravanat, J.L., Douki, T., & Cadet, J. (2001) Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J Photochem Photobiol B* 63, 88-102.
- Reid, T.M. & Loeb, L.A. (1993) Tandem double CC→TT mutations are produced by reactive

- oxygen species. *Proc Natl Acad Sci* 90, 3904-3907.
- Reif, D.W. (1992) Ferritin as a source of iron for oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 12, 417-427.
- Riviere, J., Bergeron, F., Tremblay, S., Gasparutto, D., Cadet, J., & Wagner, J.R. (2004) Oxidation of 5-Hydroxy-2'-deoxyuridine into Isodialuric Acid, Dialuric Acid, and Hydantoin Products. *J Am Chem Soc* 126, 6548-6549.
- Rush, J.D. & Bielski, B.H.J. (1985) Pulse radiolitic studies of the reaction of HO_2/O_2^- with Fe(II)/Fe(III) ions. The reactivity of HO_2/O_2^- with ferric ions and its implication on the occurrence of the Haber-Weiss reaction. *J Phys Chem* 89, 5062-5066.
- Scharer, O.D. & Jiricny, J. (2001) Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases. *BioEssays* 23, 270-281.
- Schmid, W.C. & Rubin, M.C. (1980) Pyrimidine-specific chemical reactions useful for DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* 8, 4613-4619.
- Schuchmann, N.M. & von Sonntag, C. (1983) The radiolysis of uracil in oxygenated aqueous solution. A study by product analysis and pulse radiolysis. *Journal of Chemical Society Perkin Trans II*, 1525-1531.
- Shen, J.C., Rideout, W.M. 3rd, & Jones, P.A. (1992) High frequency mutagenesis by a DNA methyltransferase. *Cell* 71, 1073-1080.
- Shen, J.C., Rideout, W.M. 3rd, & Jones, P.A. (1994) The rate of hydrolytic deamination of 5-methylcytosine in double-stranded DNA. *Nucleic Acids Res* 22, 972-976.
- Shevelev, I.V. & Hubscher, U. (2002) The 3' 5' exonucleases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 364-376.
- Slupphaug, G., Kavli, B., & Krokan, H.E. (2003) The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res* 531, 231-251.
- Sohal, R.S., Svensson, I., & Brunk, U.T. (1990) Hydrogen peroxide production by liver

- mitochondria in different species. *Mech Ageing Dev* 53, 209-215.
- Sono, M., Wataya, Y., & Hayatsu, H. (1973) Role of bisulfite in the deamination and the hydrogen isotope exchange of cytidylic acid. *J Am Chem Soc* 95, 4745-4749.
- Summers, G.A. & Drake, J.W. (1971) Bisulfite mutagenesis in bacteriophage T4. *Genetics* 68, 603-607.
- Tabatabaei, A.R. & Abbot, F.S. (1999) LC/MS analysis of hydroxylation products of salicylate as an indicator of in vivo oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 26, 1054-1058.
- Tarpey, M.M., Wink, D.A., & Grisham, M.B. (2004) Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286, R431-R444.
- Tate, P.H. & Bird, A.P. (1993) Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 3, 226-231.
- Terashima, Y., Fukuoka, M., Ohtsuka, E., & Inoue, H. (1999) Further studies of KMnO₄ oxidation of synthetic DNAs containing oxidatively damaged bases. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 35-36.
- Theruvathu, J.A., Aravindakumar, C.T., Flyunt, R., von Sonntag, J., & von Sonntag, C. (2001) Fenton chemistry of 1,3-dimethyluracil. *J Am Chem Soc* 123, 9007-9014.
- Tolmasoff, J.M., Ono, T., & Cutler, R.G. (1980) Superoxide dismutase: correlation with life-span and specific metabolic rate in primate species. *Proc Natl Acad Sci* 77, 2777-2781.
- Tremblay, S., Douki, T., Cadet, J., & Wagner, J.R. (1999) 2'-Deoxycytidine glycols, a missing link in the free radical-mediated oxidation of DNA. *J Biol Chem* 274, 20833-20838.
- Turrens, J.F. (1997) Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 17, 3-8.
- Vairapandi, M. & Duker, J.N. (1994) Excision of ultraviolet-induced photoproducts of 5-

methylocytosine from DNA. *Mutat Res* 315 , 85-94.

Van Remmen, H., Hamilton, M.L., & Richardson, A. (2003) Oxidative damage to DNA and aging. *Exerc Sport Sci Rev* 31, 149-153.

Varghese, A.J. (1975) Sensitization of thymine and uracil to ionizing radiation by p-nitroacetophenone. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 28, 477-484.

von Sonntag, C.(1987) in *Chemical Basis of Radiation Biology* von Sonntag C.Taylor & Francis London, London.

Wagner, J.R., Blount, B.C., & Weinfeld, M. (1996) Excision of oxidative cytosine modifications from gamma-irradiated DNA by Escherichia coli endonuclease III and human whole-cell extracts. *Anal Biochem* 233, 76-86.

Wagner, J.R., Decarroz, C., Berger, M., & Cadet, J. (1999) Hydroxyl-radical-induced decomposition of 2'-deoxycytidine in aerated aqueous solutions. *J Am Chem Soc* 121, 4101-4110.

Wagner, J.R., van Lier, J.E., Decarroz, C., Berger, M., & Cadet, J. (1990) Photodynamic methods for oxy radical-induced DNA damage. *Methods Enzymol* 186, 502-511.

Wagner, J.R., Vanlier, J.E., Berger, M., & Cadet, J. (1994) Thymidine hydroperoxides - structural assignment, conformational features, and thermal decomposition in water. *J Am Chem Soc* 116, 2235-2242.

Wallace, S.S. (1998) Enzymatic processing of radiation-induced free radical damage in DNA. [Review] [284 refs]. *Radiat Res* 150, S60-S79.

Wallace, S.S. (2002) Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic Biol Med* 33, 1-14.

Wang, D. & Essigmann, J.M. (1997) Kinetics of oxidized cytosine repair by endonuclease III of Escherichia coli. *Biochemistry* 36 , 8628-8633.

- Wang, D., Kreutzer, D.A., & Essigmann, J.M. (1998) Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: insights from studies using defined lesions. *Mutat Res* 400, 99-115.
- Ward, J.F. (1985) Biochemistry of DNA lesions. *Radiat Res Suppl* 8, S103-S111.
- Wiberg, K.B. & Saegebarth, K.A. (1957) The Mechanisms of Permanganate Oxidation. IV. Hydroxylation of Olefins and Related Reactions. *J ChemSoc* 79, 2822-2824.
- Wiseman, H. & Halliwell, B. (1996) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. [Review] [213 refs]. *Biochem J* 313, 17-29.
- Wolfe, J.L., Kawate, T., Sarracino, D.A., Zillmann, M., Olson, J., Stanton, V.P. Jr, & Verdine, G.L. (2002) A genotyping strategy based on incorporation and cleavage of chemically modified nucleotides. *Proc Natl Acad Sci* 99, 11073-11078.
- Wolffe, A.P. (1996) Histone deacetylase: a regulator of transcription. *Science* 272, 371-372.
- Wood, R.D., Mitchell, M., Sgouros, J., & Lindahl, T. (2001) Human DNA repair genes. *Science* 291, 1284-1289.
- Wu, S., Spiro, T.G., Sowers, L.C., & Fresco, J.R. (1999) Identification by UV resonance Raman spectroscopy of a imino tautomer of 5-hydroxy-2'-deoxycytidine, a powerful base analog transition mutagen with a much higher unfavored tautomer frequency than that of the natural 2'-deoxycytidine. *Proc Natl Acad Sci* 96, 4500-4505.
- Wyszynski, M., Gabbara, S., & Bhagwat, A.S. (1994) Cytosine deaminations catalyzed by DNA cytosine methyltransferases are unlikely to be the major cause of mutational hot spots at sites of cytosine methylation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* 91, 1574-1578.
- Young, I.S. & Woodside, J.V. (2001) Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 54, 176-186.
- Yu, Z., Chen, J., Ford, B.N., Brackley, M.E., & Glickman, B.W. (1999) Human DNA repair

systems: an overview. *Environ Mol Mutagen* 33, 3-20.

Zuo, S., Boorstein, R.J., & Teebor, G.W. (1995) Oxidative damage to 5-methylcytosine in DNA. *Nucleic Acids Res* 23, 3239-3243.

Annexe I

Oxidation of 5-Hydroxy-2'-Deoxyuridine into Isodialuric Acid, Dialuric Acid and hydantoin Products

Johann Rivière, François Bergeron, Sébastien Tremblay, Didier Gasparuto, Jean Cadet and J. Richard Wagner

Journal of American Chemical Society 126(21): 6548-6549; 2004

Supporting Information (6 pages)

Oxidation of 5-Hydroxy-2'-Deoxyuridine into Isodialuric Acid, Dialuric Acid and Hydantoin Products. Johann Rivière, François Bergeron, Sébastien Tremblay, Didier Gasparutto, Jean Cadet and J. Richard Wagner.

Experimental section

5-Hydroxy-2'-deoxyuridine (5-oh-dUrd) was synthesized by bromination of 2'-deoxyuridine in water followed by treatment with collidine, according to a reported procedure (Fujimoto, J.; Tran, L.; Sowers, L.C. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 1254-1258). High performance liquid chromatography (HPLC) was carried using the following equipment: Model LC-10AD pump (Shimadzu, Tokyo, Japan), Model SIL-HT autoinjector (Shimadzu), Model 480 UV detector (Waters, Milford, MA), and Model RI-3 refractive index detector (Varian Inc., Palo Alto, CA). Data was acquired with the aid of Millenium (v. 3.05.01; Waters). Oxidation products of 5-oh-dUrd were separated using three octadecylsilyl silica gel columns connected in tandem: the first column was platinum EPS 3 μ m 100 $^{\circ}$ A 53 mm length x 7 mm i.d. (Alltech Associates, Inc., Deerfield, IL), followed by two ODS-A 5 μ m 120 $^{\circ}$ A 250 mm length x 6 mm i.d. (YMC, Inc, Kyoto, Japan). ^1H NMR and ^{13}C NMR were recorded on a Bruker AM300 spectrometer equipped with an Aspect 3000 computer. Mass spectrometry analyses of nucleosides were performed by ESI-TOF-MS (Q-Tof2, Micromass UK Ltd., Manchester, UK). The samples were dissolved in 50% acetonitrile in water containing 1 mM NaCl, infused at 0.2 $\mu\text{l}/\text{min}$ and electrosprayed in positive ion mode with 1.5 kV applied to the solvent. Calibration was performed using a solution of sodium/cesium iodide covering the m/z range from 200 to 1500. The cone voltage was set to 35V and scan time was 2 sec/scan. Mass spectrometry analyses of trinucleotides was carried out by ESI-MS in the negative mode using an LCQ ion trap (ThermoFinnigen, San Jose, CA) and samples (10 μM) dissolved in acetonitrile and water (50/50, v/v) containing 1% triethylamine.

Oxidation of 5-hydroxy-2'-deoxyuridine (5-oh-dUrd)

The oxidation products of 5-oh-dUrd were prepared by bromination. Two hundred mg of 5-oh-dUrd (**1**) was dissolved in 5 ml of water and stirred at 4 $^{\circ}\text{C}$. Small proportions (10-100 μl) of Br_2 were added until a yellow coloration persisted. The solution was flushed with argon to eliminate traces of Br_2 and kept on ice until purification. Two isomeric products were separated by HPLC (see above) using 0.5% CH_3COOH in water as the mobile phase. The oxidation of 5-oh-dUrd oxidation by Br_2 , KMnO_4 and Na_2IrBr_6 was studied in solutions containing 10 mM 5-oh-dUrd, 2.5-20 mM oxidant and 50 mM sodium phosphate buffer (pH 3-9). The oxidation of 5-oh-dUrd by photosensitization was carried out by near UV photolysis of 10 mM 5-oh-dUrd and 0.5 mM 2-methyl-1,4-naphthoquinone in aerated aqueous solution. Lastly, the oxidation of d(Tp5HUpT) (200 μM) was done by treatment with Na_2IrBr_6 (200 μM) in phosphate buffered water (10 mM, pH 7.0) containing 100 mM NaCl. The mixture was left at room temperature for 1 h and the product was purified by reversed phase HPLC (50 mM TEAE) using a gradient elution from 2 to 20% CH_3CN in water over a period of 30 m. The product eluted at 20 min d(Tp5HUpT) was prepared on a DNA synthesizer (Applied Biosystems, Foster City, CA). The trinucleotide was deprotected and purified by HPLC before experiments.

1-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-isodialuric acid (2a, minor isomer). ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, TMS): 10.3 (s, 1, N₃H), 6.7 (s, 1, C₅OH), 6.6 (s, 1, C₅OH), 5.9 (dd, 1, H_{1'}), 6.1 (d, 1, C₆OH), 5.1 (d, 1, C₃OH), 4.7 (t, 1, C₅OH), 4.7 (d, 1, H₆), 4.1 (m, 1, H₃), 3.4 (m, 1, H₄), 3.4 (m, 2, H₅, H_{5'}), 2.1 (m, 1, H₂), 1.8 (m, 1, H₂). LC/MS ES+ (50% CH₃CN, 1 mM NaCl) m/z (relative intensity): 579 (2M-2H+Na, 25), 301 (M-H+Na, 100).

1-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-isodialuric acid (2b, major isomer). ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, TMS): 10.3 (s, 1, N₃H), 6.9 (s, 1, C₅OH), 6.6 (s, 1, C₅OH), 6.1 (pst, 1, H_{1'}), 5.9 (d, 1, C₆OH), 5.2 (d, 1, C₃OH), 5.0 (t, 1, C₅OH), 4.6 (d, 1, H₆), 4.1 (m, 1, H₃), 3.4 (m, 1, H₄), 3.4 (m, 2, H₅, H_{5'}), 2.1 (m, 1, H₂), 1.9 (m, 1, H₂). ¹³C-NMR (100.62 MHz, D₂O, TMS): 169 (C=O), 152 (C=O), 88.5 (C₅), 85.2 (C₄), 84.9 (C₁), 77.9 (C₆), 70.1 (C₃), 60.9 (C₅), 36 (C₂). LC/MS ES+ (50% CH₃CN, 1 mM NaCl) m/z (relative intensity): 579 (2M-2H+Na, 25), 301 (M-H+Na, 100). LC/MS/MS 301 m/z (50% CH₃CN, 1 mM NaCl) m/z (relative intensity) 301 (M-H+Na, 100); 283 (M-H+Na-H₂O, 80); 255 (5); 185 (M-H+Na-sugar, 20); 167(45); 139 (30).

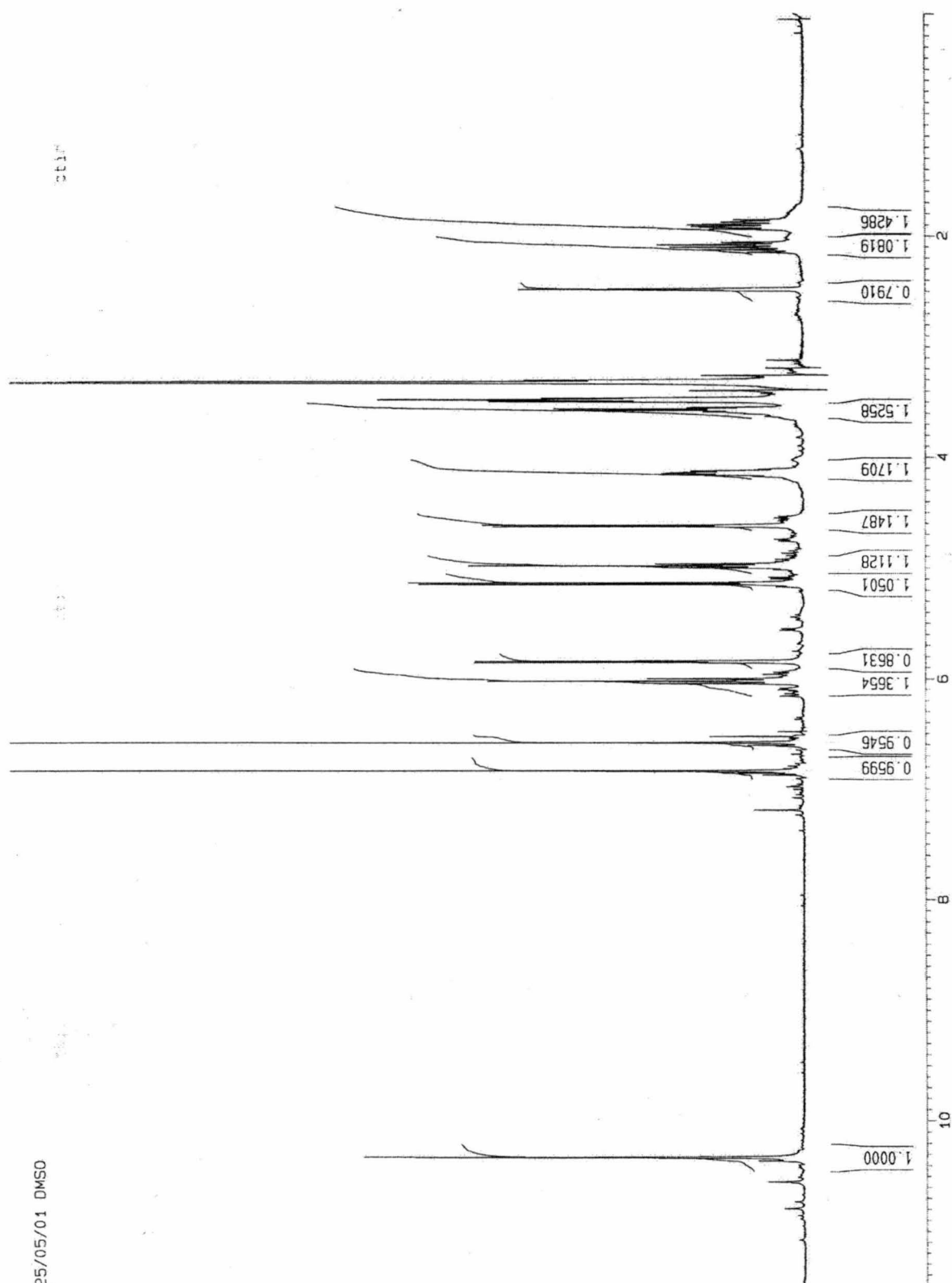
1-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-dialuric acid (3a, major isomer). ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, TMS): 11 (br, 1, N₃H), 7.0 (br, 1, C₅OH), 6.9 (s, 1, C₆OH), 6.6 (s, 1, C₆OH), 5.8 (pst, 1, H_{1'}), 5.3 (d, 1, C₅H), 5.1 (d, 1, C₃OH), 4.8 (t, 1, C₅OH), 4.1 (m, 1, H₃), 3.6 (m, 1, H₄), 3.4 (m, 2, H₅, H_{5'}), 2.4 (m, 1, H₂), 1.9 (m, 1, H₂). ¹³C-NMR (100.62 MHz, D₂O, TMS): 173 (C=O), 156 (C=O), 89.3 (C₅), 87.6 (C₆), 85.7 (C₄), 82.3 (C₁), 71.1 (C₃), 61.7 (C₅), 35 (C₂). LC/MS ES+ (50% CH₃CN, 1 mM NaCl) m/z (relative intensity): 579 (2M-2H+Na, 30), 301 (M-H+Na, 100). LC/MS/MS 301 m/z (50% CH₃CN, 1 mM NaCl) m/z (relative intensity) 301 (M-H+Na, 65); 283 (M-H+Na-H₂O, 100); 255 (5); 283 (45); 255 (45); 185 (M-H+Na-sugar, 95); 167(10); 139 (40).

1-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-dialuric acid (3b, minor isomer). ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, TMS): 10.9 (br, 1, N₃H), 7.0 (br, 1, C₅OH), 6.9 (s, 1, C₆OH), 6.5 (s, 1, C₆OH), 5.6 (dd, 1, H_{1'}), 5.2 (d, 1, C₅H), 5.1 (d, 1, C₃OH), 4.7 (t, 1, C₅OH), 4.1 (m, 1, H₃), 3.6 (m, 1, H₄), 3.4 (m, 2, H₅, H_{5'}), 2.4 (m, 1, H₂), 1.9 (m, 1, H₂). LC/MS ES+ (50% CH₃CN, 1 mM NaCl) m/z (relative intensity): 579 (2M-2H+Na, 30), 301 (M-H+Na, 100).

1-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5-hydroxyhydantoin (4a). ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, TMS): 11 (br, 1, N₃H), 6.9 (d, 1, C₅OH), 5.8 (pst, 1, H_{1'}), 5.3 (d, 1, C₅H), 4.1 (m, 1, H₃), 3.6 (m, 1, H₄), 3.4 (m, 2, H₅, H_{5'}), 2.4 (m, 1, H₂), 1.8 (m, 1, H₂). LC/MS ES+ (50% CH₃CN, 1 mM NaCl) m/z (relative intensity): 531 (2M-H+2Na, 20), 277 (M-H+2Na, 30), 255 (M+Na, 100). LC/MS/MS 301 m/z (50% CH₃CN, 1 mM NaCl) m/z (relative intensity) 255 (M+Na, 100); 182 (40); 139 (45); 113 (35); 80 (5).

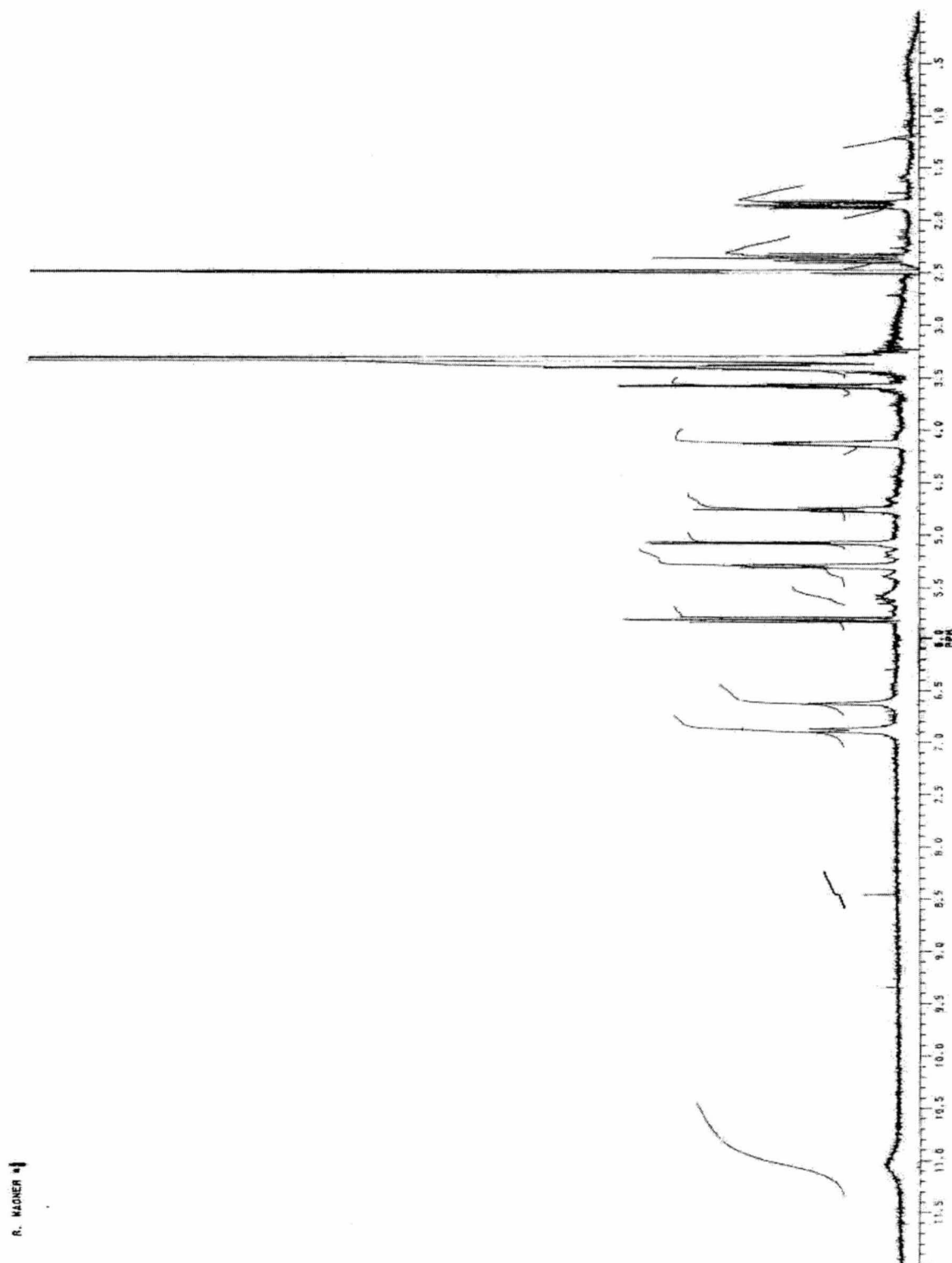
1-(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuranosyl)-5-hydroxyhydantoin (4b). ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆, TMS): 10.9 (br, 1, N₃H), 6.9 (br, 1, C₅OH), 5.6 (pst, 1, H_{1'}), 5.2 (d, 1, C₅H), 5.3 (d, 1, H₅), 4.1 (m, 1, H₃), 3.6 (m, 1, H₄), 3.4 (m, 2, H₅, H_{5'}), 2.4 (m, 1, H₂), 1.8 (m, 1, H₂). LC/MS ES+ (50% CH₃CN, 1 mM NaCl) m/z (relative intensity): 531 (2M-H+2Na, 20), 277 (M-H+2Na, 35), 255 (M+Na, 100).

Figure S1. ^1H -NMR of product **2b** in DMSO-d_6 .



25/05/01 DMSO

Figure S2. ^1H -NMR of product **3a** in DMSO-d_6 .



R. MADHER

Figure S3. ^{13}C -NMR of product **2b**. The spectrum shows two compounds. The major compound is product **2b** and the minor compound is **3a**.

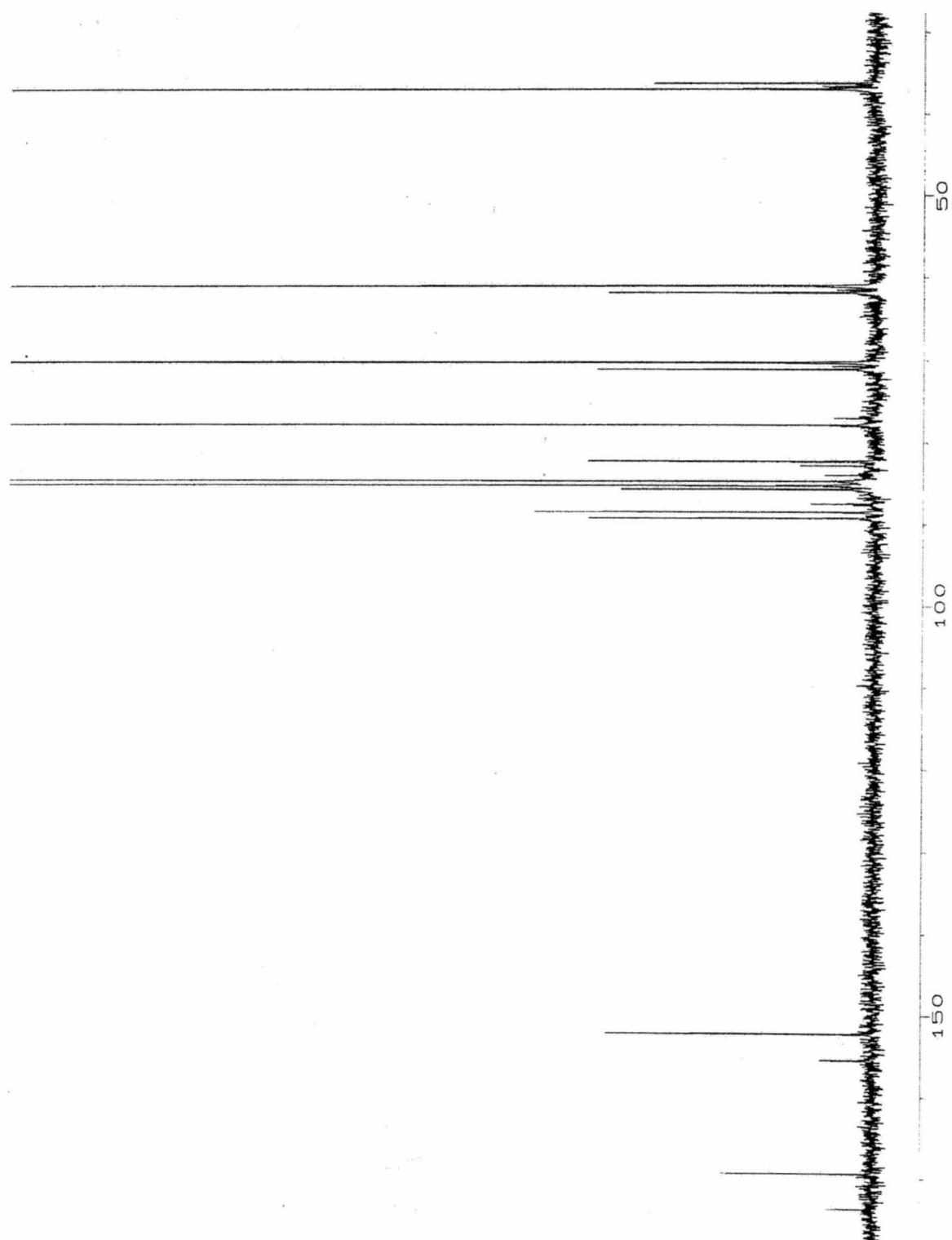
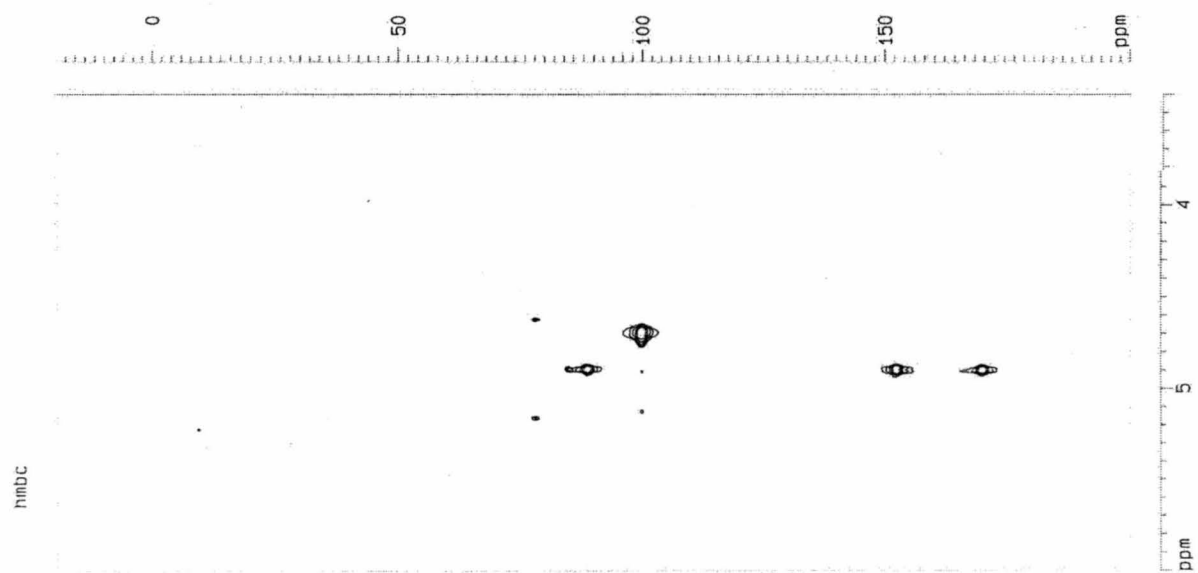


Figure S4. HMBC of product **2b**.



Annexe II

Incorporation of two deoxycytidine oxidation products into cellular DNA

J.Richard Wagner, Sébastien Tremblay, Bonnie Gowans, and Darel J. Hunting

Biochemistry and Cell Biology 75(4): 377-381; 1997